

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
 COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



4

REC'D 26 NOV 1999	
WIPO	PCT

**Bescheinigung**

Die BASF Aktiengesellschaft in Ludwigshafen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und deren Überproduktion in Pflanzen"

am 1. Oktober 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die Anmeldung ist auf das Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben/Deutschland umgeschrieben worden.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung, von denen die Beschreibung, die Patentansprüche sowie die Abbildungen 1 bis 3 und 5 bis 7 am 1. Oktober 1998 und die Abbildung 4 am 10. Oktober 1998 eingegangen sind.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole A 01 H und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 18. Oktober 1999

**Deutsches Patent- und Markenamt**

**Der Präsident**

Im Auftrag

Jerofsky

Aktenzeichen: 198 45 216.0

M 23.10.99

## Patentansprüche

1. Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt.
2. Verwendung einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 1 und einer DNA-Sequenz SEQ ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen kodierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und/oder Carotinoiden.
3. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in Pflanzen exprimiert werden.
4. Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man eine Expressionskassette enthaltend einen Promotor und DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und 3 in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzenzellen einbringt.
5. Verfahren zur Transformation von Pflanzen gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Transformation mit Hilfe des Stammes Agrobacterium tumefaciens, der Elektroporation oder der particle bombardment Methode erfolgt.
6. Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt enthaltend eine Expressionskassette gemäß Anspruch 4.
7. Pflanze nach Anspruch 6, ausgewählt aus der Gruppe Soja, Canola, Gerste, Hafer, Weizen, Raps, Mais oder Sonnenblume.

DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase und eine Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und deren Überproduktion in Pflanzen

5

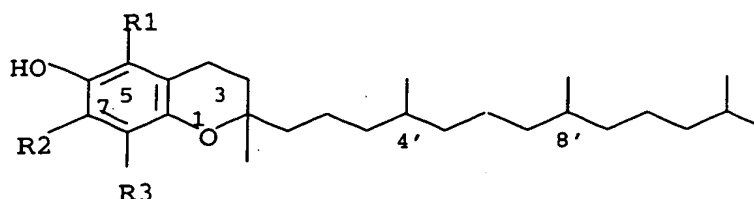
## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von DNA-Sequenzen codierend für eine 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS) und codierend für eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD) zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, speziell die Verwendung von DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, einem Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt, sowie die derart hergestellte Pflanze selbst.

Ein wichtiges Ziel pflanzenmolekulargenetischer Arbeiten ist bisher die Erzeugung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Zuckern, Enzymen und Aminosäuren. Wirtschaftlich interessant ist jedoch auch die Entwicklung von Pflanzen mit erhöhtem Gehalt an Vitaminen, wie z.B. der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes.

Die in der Natur vorkommenden acht Verbindungen mit Vitamin E-Aktivität sind Derivate des 6-Chromanols (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Vol. A 27 (1996), VCH Verlagsgesellschaft, Chapter 4., 478-488, Vitamin E). Die erste Gruppe (1a-d) stammt von Tocopherol ab, die zweite Gruppe besteht aus Derivaten des Tocotrienols (2a-d):

35

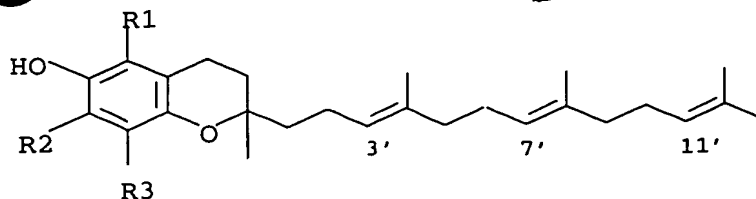


- 40 1a,  $\alpha$ -Tocopherol:  $R^1 = R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
1b,  $\beta$ -Tocopherol [148-03-8]:  $R^1 = R^3 = \text{CH}_3$ ,  $R^2 = \text{H}$   
1c,  $\gamma$ -Tocopherol [54-28-4]:  $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = R^3 = \text{CH}_3$   
1d,  $\delta$ -Tocopherol [119-13-1]:  $R^1 = R^2 = \text{H}$ ,  $R^3 = \text{CH}_3$

45

M 23.10.99

5



- 2a,  $\alpha$ -Tocotrienol [1721-51-3]: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = CH<sub>3</sub>  
10 2b,  $\beta$ -Tocotrienol [490-23-3]: R<sup>1</sup> = R<sup>3</sup> = CH<sub>3</sub>, R<sup>2</sup> = H  
2c,  $\gamma$ -Tocotrienol [14101-61-2]: R<sup>1</sup> = H, R<sup>2</sup> = R<sup>3</sup> = CH<sub>3</sub>  
2d,  $\delta$ -Tocotrienol [25612-59-3]: R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = H, R<sup>3</sup> = CH<sub>3</sub>

Wirtschaftlich große Bedeutung besitzt  $\alpha$ -Tocopherol.

15

- Der Entwicklung von Kulturpflanzen mit erhöhtem Tocopherol-Gehalt durch Gewebekultur oder Samenmutagenese und natürliche Auswahl sind Grenzen gesetzt. So muß einerseits der Tocopherol-Gehalt bereits in Gewebekultur erfaßbar sein und andererseits können  
20 nur diejenigen Pflanzen über Gewebekulturtechniken manipuliert werden, deren Regeneration zu ganzen Pflanzen aus Zellkulturen gelingt. Außerdem können Kulturpflanzen nach Mutagenese und Selektion unerwünschte Eigenschaften zeigen, die durch teilweise mehrmalige Rückkreuzungen wieder beseitigt werden müssen. Auch  
25 wäre die Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes durch Kreuzung auf Pflanzen der selben Art beschränkt.

- Aus diesen Gründen ist das gentechnische Vorgehen, die für die Tocopherol Syntheseleistung kodierenden, essentiellen Biosynthese-  
30 segene zu isolieren und in Kulturpflanzen gezielt zu übertragen, dem klassischen Züchtungsverfahren überlegen. Dieses Verfahren setzt voraus, daß die Biosynthese und deren Regulation bekannt ist und daß Gene, die die Biosyntheseleistung beeinflussen, identifiziert werden.

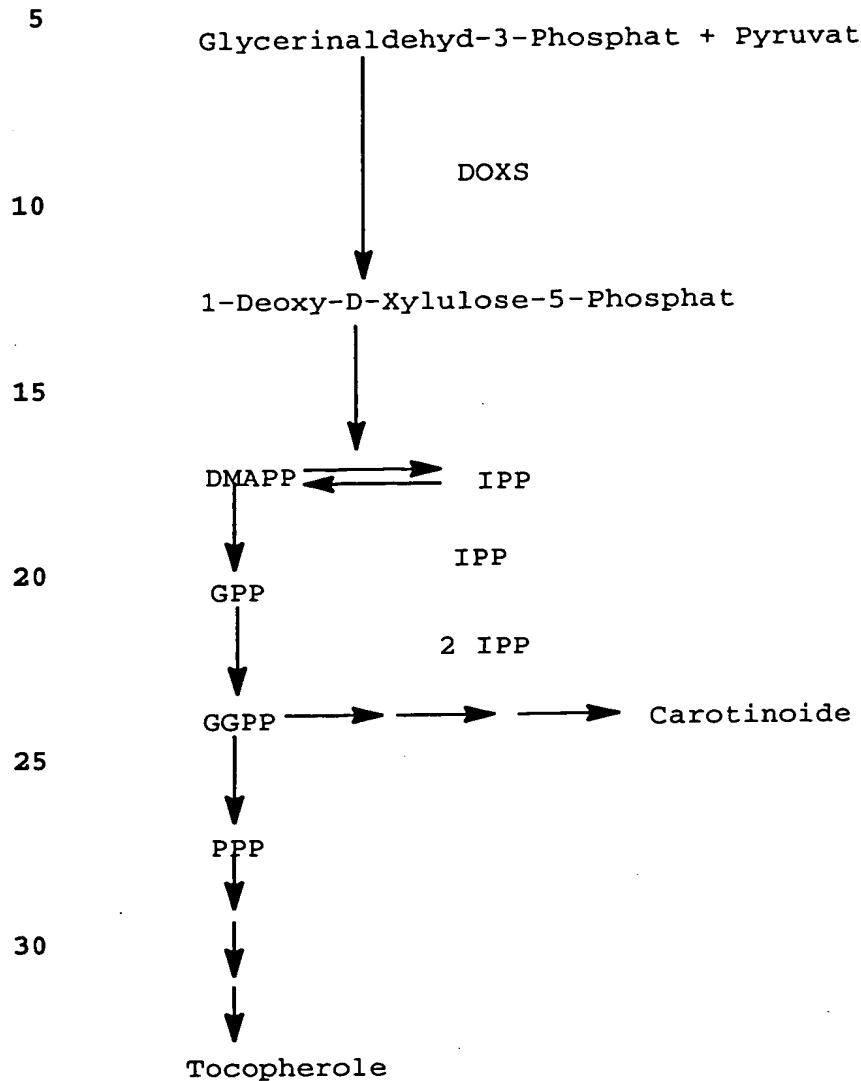
35

- Isoprenoide oder Terpenoide bestehen aus verschiedenen Klassen lipidlöslicher Moleküle und werden teilweise oder vollständig aus C<sub>5</sub>-Isopren-Einheiten gebildet. Reine Prenyllipide (z.B. Carotinoide) bestehen aus C-Gerüsten, die ausschließlich auf  
40 Isopren-Einheiten zurückgehen, während gemischte Prenyllipide (z.B. Chlorophyll) eine Isoprenoid-Seitenkette besitzen, die mit einem aromatischen Kern verbunden ist.

- Ausgangspunkt der Biosynthese von Prenyllipiden sind 3 x Acetyl-  
45 CoA Einheiten, die über  $\beta$ -Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) und Mevalonat in die Ausgangs-Isopren-Einheit (C<sub>5</sub>), dem Isopentenylpyrophosphat (IPP), umgewandelt werden. Kürzlich wurde durch in

11.23.10.99

vivo Fütterungsexperimente mit  $C^{13}$  gezeigt, daß in verschiedenen Eubakterien, Grünalgen und pflanzlichen Chloroplasten ein Mevalonat-unabhängiger Weg zur Bildung von IPP beschritten wird:



Dabei werden Hydroxyethylthiamin, das durch Decarboxylierung von Pyruvat entsteht, und Glycerinaldehyd-3-Phosphat (3-GAP) in einer  
 40 durch die 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase vermittelten "Transketolase"-Reaktion zunächst in 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat umgewandelt (Schwender et al., FEBS Lett. 414(1), 129-134(1997); Arigoni et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 94(2), 10600-10605 (1997); Lange et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA  
 45 95(5), 2100-2104(1998); Lichtenthaler et al., FEBS Lett. 400(3), 271-274(1997). Dieses wird dann durch eine intramolekulare Umordnung in IPP umgesetzt (Arigoni et al., 1997). Biochemische Daten

M 23.10.99  
4...

- deuten darauf hin, daß der Mevalonat-Weg im Zytosol operiert und zur Bildung von Phytosterolen führt. Das Antibiotikum Mevinolin, ein spezifischer Inhibitor der Mevalonat-Bildung, führt lediglich zur Inhibition der Sterol-Biosynthese im Zytoplasma, während die
- 5 Prenyllipid-Bildung in den Plastiden unbeeinflusst ist (Bach und Lichtenthaler, *Physiol. Plant* 59(1993), 50-60). Der Mevalonat-unabhängige Weg ist dagegen plastidär lokalisiert und führt vornehmlich zur Bildung von Carotinoiden und plastidären Prenyllipiden (Schwender et al., 1997; Arigoni et al., 1997).
- 10 IPP steht im Gleichgewicht mit seinem Isomer, dem Dimethylallyl Pyrophosphat (DMAPP). Eine Kondensation von IPP mit DMAPP in Kopf-Schwanz Anlagerung ergibt das Monoterpen (C<sub>10</sub>) Geranyl-Pyrophosphat (GPP). Die Addition von weiteren IPP Einheiten führt zum
- 15 Sesquiterpen (C<sub>15</sub>), Farnesy-Pyrophosphat (FPP) und zum Diterpen (C<sub>20</sub>) Geranyl-Geranyl-Pyrophosphat (GGPP). Die Verknüpfung zweier GGPP Moleküle führt zur Bildung der C<sub>40</sub>-Vorläufer für Carotinoide. GGPP wird durch eine Prenylketten-Hydrogenase zum Phytyl-Pyrophosphat (PPP) umgeformt, dem Ausgangsstoff für die weitere
- 20 Bildung von Tocopherolen.

- Bei den Ringstrukturen der gemischten Prenyllipide, die zur Bildung der Vitamine E und K führen, handelt es sich um Quinone, deren Ausgangsmetabolite aus dem Shikimat-Weg stammen. Die aroma-
- 25 tischen Aminosäuren Phenylalanin bzw. Tyrosin werden in Hydroxyphenyl-Pyruvat umgewandelt, welches durch Dioxygenierung in Homogentisinsäure überführt wird. Diese wird an PPP gebunden, um den Vorläufer von  $\alpha$ -Tocopherol und  $\alpha$ -Tocoquinon, das 2-Methyl-6-phytylquinol, zu bilden. Durch Methylierungsschritte mit S-Adenosyl-
- 30 methionin als Methyl-Gruppen-Donor entsteht zunächst 2,3-Dimethyl-6-phytylquinol, dann durch Zyklisierung  $\gamma$ -Tocopherol und durch nochmalige Methylierung  $\alpha$ -Tocopherol (Richter, *Biochemie der Pflanzen*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1996).
- 35 In der Literatur finden sich Beispiele die zeigen, daß die Manipulation eines Enzyms den Metabolit-Fluß directional beeinflussen kann. In Experimenten mit einer veränderten Expression der Phytoen Synthase, welche zwei GGPP-Moleküle zu 15-cis-Phytoen miteinander verknüpft, konnte ein direkter Einfluß auf die Caro-
- 40 tinoid-Mengen dieser transgenen Tomatenpflanzen gemessen werden (Fray und Grierson, *Plant Mol.Biol.* 22(4), 589-602(1993); Fray et al., *Plant J.*, 8, 693-701(1995)). Wie zu erwarten, zeigen transgene Tabakpflanzen mit verringerten Mengen an Phenylalanin-Ammonium Lyase reduzierte Phenylpropanoid-Mengen. Das Enzym
- 45 Phenylalanin-Ammonium Lyase katalysiert den Abbau von Phenylalanin, entzieht es also der Phenylpropanoid-Biosynthese (Bate et

123.10.99  
5.....

al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 91 (16): 7608-7612 (1994); Howles et al., Plant Physiol. 112. 1617-1624 (1996)).

- Über die Erhöhung des Metabolitflusses zur Steigerung des Tocopherol-Gehaltes in Pflanzen durch Überexpression einzelner Biosynthesegene ist bisher wenig bekannt. Lediglich WO 97/27285 beschreibt eine Modifikation des Tocopherol-Gehaltes durch verstärkte Expression bzw. durch Herunterregulation des Enzyms p-Hydroxyphenylpyruvatdioxygenase (HPPD).
- 10 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden.
- 15 Die Aufgabe wurden überraschenderweise gelöst durch die Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase (DOXS)-Gens und eines p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD)-Gens in den Pflanzen, siehe Abbildung 1.
- 20 Um den Metabolit-Fluß aus dem Primärstoffwechsel in den Isoprenoid-Stoffwechsel zu verstärken, wurde die Bildung von IPP als allgemeines Ausgangssubstrat für alle plastidären Isoprenoide erhöht. Zu diesem Zweck wurde in transgenen Tabak- und Rapspflanzen die Aktivität der DOXS durch Überexpression der DOXS aus E.coli
- 25 erhöht. Dies kann durch Expression homologer oder anderer heterologer Gene erreicht werden. DOXS-Nukleotidsequenzen sind aus Arabidopsis thaliana (Acc. No. U 27099), Reis (Acc. No. AF024512) und Pfefferminze (Acc. No. AF019383) beschrieben.
- 30 In einem Ausführungsbeispiel wird das DOXS-Gen aus E.coli (SEQ-ID No. 1; Rosa Putra et al., Tetrahedron Lett. 39(1998), 23-26; Acc. No.035440) in transgenen Pflanzen verstärkt exprimiert. Um eine Plastidenlokalisation zu gewährleisten wird der E.coli DOXS in einem weiteren Konstrukt eine Transitsignalsequenz vorangestellt.
- 35 Auch geeignet als Expressionskassette ist eine DNA-Sequenz, die für ein DOXS-Gen codiert, das mit Seq-ID No. 1 hybridisiert und das aus anderen Organismen bzw. aus anderen Pflanzen stammt.
- Das nun vermehrt zur Verfügung stehende D-1-Desoxy-Xylulose-5-Phosphat wird weiter in Richtung Tocopherole und Carotinoide umgesetzt.
- Darüberhinaus verstärkt die Bildung von Homogentisinsäure den Metabolitfluß weiter in Richtung von Phytylquinonen und damit
- 45 Tocopherol, siehe Abbildung 1. Homogentisinsäure wird gebildet aus p-Hydroxyphenylpyruvat durch das Enzym p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase (HPPD). cDNAs, die für dieses Enzym kodieren, wurden

M 23.10.99

aus verschiedenen Organismen wie beispielsweise aus Mikroorganismen, aus Pflanzen und aus dem Menschen beschrieben.

In Ausführungsbeispiel 4 wurde erstmals das HPPD-Gen aus Streptomyces avermitilis (Denoya et al., J. Bacteriol. 176(1994), 5312-5319; SEQ-ID No. 3) zusammen mit der DOXS aus E.coli in Pflanzen und pflanzlichen Plastiden überexprimiert.

- Die Erhöhung der plastidären IPP Bildung führt zur verstärkten Bildung aller plastidären Isoprenoide. Die erhöhte Bereitstellung von Homogentisinsäure gewährleistet, daß genügend Substrat für die Bildung von Tocopherolen in den Plastiden zur Verfügung steht. Dieses nun vermehrt zur Verfügung stehende Homogentisat kann in den transgenen Pflanzen seinerseits mit der durch die Überexpression der DOXS erhöhten Menge an Phytyldiphosphat (PPP) umgesetzt werden. PPP nimmt dabei eine Schlüsselstellung ein, da es einerseits als Ausgangssubstrat für Chlorophylle und Phylloquinone, andererseits für Tocopherole dient.
- Die Herstellung der transgenen Pflanzen erfolgt durch Transformation der Pflanzen mit einem das DOXS- und das HPPD-Gen enthaltenden Konstrukt. Als Modellpflanzen für die Produktion von Tocopherolen, Vitamin K, Chlorophyllen und Carotinoiden wurden Tabak und Raps eingesetzt.
- Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3, die für eine DOXS bzw. HPPD oder deren funktionelle Äquivalente kodieren, zur Herstellung einer Pflanze mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt. Die Nukleinsäuresequenzen können dabei z.B. DNA- oder cDNA-Sequenzen sein. Zur Insertion in eine Expressionskassette geeignete kodierende Sequenzen sind beispielsweise solche, die für eine DOXS bzw. HPPD kodieren und die dem Wirt die Fähigkeit zur Überproduktion von Tocopherol verleihen.
- Die Expressionskassetten beinhalten außerdem regulative Nukleinsäuresequenzen, welche die Expression der kodierenden Sequenz in der Wirtszelle steuern. Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt eine Expressionskassette stromaufwärts, d.h. am 5'-Ende der kodierenden Sequenz, einen Promotor und stromabwärts, d.h. am 3'-Ende, ein Polyadenylierungssignal und gegebenenfalls weitere regulatorische Elemente, welche mit der dazwischenliegenden kodierenden Sequenz für das DOXS- bzw. HPPD-Gen operativ verknüpft sind. Unter einer operativen Verknüpfung versteht man die sequenzielle Anordnung von Promotor, kodierender Sequenz, Terminator und ggf. weiterer regulativer Elemente derart, daß jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Expression der

7

5 kodierenden Sequenz bestimmungsgemäß erfüllen kann. Die zur operativen Verknüpfung bevorzugten aber nicht darauf beschränkten Sequenzen sind Targeting-Sequenzen zur Gewährleistung der subzellulären Lokalisation im Apoplasten, in der Vakuole, in Plastiden, im Mitochondrium, im Endoplasmatischen Retikulum (ER), im Zellkern, in Ölkörperchen oder anderen Kompartimenten und Translationsverstärker wie die 5'-Führungssequenz aus dem Tabak-Mosaik-Virus (Gallie et al., Nucl. Acids Res. 15 (1987), 8693 -8711).

10 Beispielhaft kann die pflanzliche Expressionskassette in den Tabak-Transformationsvektor pBinAR-Hyg eingebaut werden. Abb. 2 zeigt die Tabaktransformationsvektoren pBinAR-Hyg mit 35S-Promotor (A) bzw. pBinAR-Hyg mit samenspezifischem Promotor Phaseolin 796 (B):

15

- HPT: Hygromycin-Phosphotransferase
- OCS: Octopin-Synthase-Terminator
- PNOS: Nopalinsynthase-Promotor
- außerdem sind solche Restriktionsschnittstellen eingezeichnet, die nur einmal den Vektor schneiden.

20

Als Promotoren der Expressionskassette ist grundsätzlich jeder Promotor geeignet, der die Expression von Fremdgenen in Pflanzen steuern kann. Vorzugsweise verwendet man insbesondere einen pflanzlichen Promotor oder einen Promotor, der einem Pflanzenvirus entstammt. Insbesondere bevorzugt ist der CaMV 35S-Promotor aus dem Blumenkohl-Mosaik-Virus (Franck et al., Cell 21 (1980), 285 - 294). Dieser Promotor enthält bekanntlich unterschiedliche Erkennungssequenzen für transkriptionale Effektoren, die in ihrer Gesamtheit zu einer permanenten und konstitutiven Expression des eingeführten Gens führen (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989), 2195-2202).

Die Expressionskassette kann auch einen chemisch induzierbaren Promotor enthalten, durch den die Expression des exogenen DOXS- bzw. HPPD-Gens in der Pflanze zu einem bestimmten Zeitpunkt gesteuert werden kann. Derartige Promotoren wie z.B. der PRP1-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993), 361-366), ein durch Salizylsäure induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein durch Benzenesulfonamid-induzierbarer (EP-A 388186), ein durch Tetrazyklin-induzierbarer (Gatz et al., (1992) Plant J. 2, 397-404), ein durch Abscisinsäure-induzierbarer (EP-A 335528) bzw. ein durch Ethanol- oder Cyclohexanon-induzierbarer (WO 93/21334) Promotor können u.a. verwendet werden.

45

M 23.10.99

Weiterhin sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, die die Expression in Geweben oder Pflanzenteilen sicherstellen, in denen die Biosynthese von Tocopherol bzw. dessen Vorstufen stattfindet. Insbesondere zu nennen sind Promotoren, die eine blattspezifische Expression gewährleisten. Zu nennen sind der Promotor der cytosolischen FBPase aus Kartoffel oder der ST-LSI Promotor aus Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445 - 245).

- 10 Mit Hilfe eines samenspezifischen Promotors konnte ein Fremdprotein stabil bis zu einem Anteil von 0,67 % des gesamten löslichen Samenproteins in den Samen transgener Tabakpflanzen exprimiert werden (Fiedler und Conrad, Bio/Technology 10 (1995), 1090-1094). Die Expressionskassette kann daher beispielsweise einen samenspezifischen Promotor (bevorzugt den Phaseolin-
- 15 Promotor (US 5504200), den USP- (Baumlein, H. et al., Mol. Gen. Genet. (1991) 225 (3), 459 - 467) oder LEB4-Promotor (Fiedler und Conrad, 1995)), das LEB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und ein ER-Retentionssignal enthalten.
- 20 Die Herstellung einer Expressionskassette erfolgt durch Fusion eines geeigneten Promotors mit einer geeigneten DOXS- bzw. HPPD-DNA Sequenz und vorzugsweise einer zwischen Promotor und DOXS- bzw. HPPD-DNA-Sequenz inserierten DNA, die für ein chloroplastenspezifisches Transitpeptid kodiert, sowie einem Polyadenylierungssignal nach gängigen Rekombinations- und Klonierungstechniken, wie sie beispielsweise in T. Maniatis, E.F. Fritsch und J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989) sowie in T.J. Silhavy, M.L. Berman und L.W. Enquist, Experiments with Gene Fusions, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1984) und in Ausubel, F.M. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley-Interscience (1987) beschrieben sind.
- 30 Insbesondere bevorzugt sind Sequenzen, die ein Targeting in den Apoplasten, in Plastiden, in die Vakuole, in das Mitochondrium, in das Endoplasmatische Retikulum (ER) oder durch ein Fehlen entsprechender operativer Sequenzen einen Verbleib im Kompartiment des Entstehens, dem Zytosol, gewährleisten (Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996), 285-423). Für die Menge der Proteinakkumulation in transgenen Pflanzen besonders förderlich erwiesen hat sich eine Lokalisation im ER (Schouten et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781-792).
- 45 Es können auch Expressionskassetten verwendet werden, deren DNA-Sequenz für ein DOXS- bzw. HPPD-Fusionsprotein kodiert, wobei ein Teil des Fusionsproteins ein Transitpeptid ist, das die Translo-

M 23. 10. 99

- kation des Polypeptides steuert. Bevorzugt sind für die Chloroplasten spezifische Transitpeptide, welche nach Translokation des DOXS- bzw. HPPD-Gens in die Chloroplasten vom DOXS- bzw. HPPD-Teil enzymatisch abgespalten werden. Insbesondere bevorzugt ist
- 5 das Transitpeptid, das von der plastidären Transketolase (TK) oder einem funktionellen Äquivalent dieses Transitpeptids (z.B. dem Transitpeptid der kleinen Untereinheit der Rubisco oder der Ferredoxin NADP Oxidoreduktase) abgeleitet ist.
- 10 Besonders bevorzugt sind DNA-Sequenzen von drei Kassetten des Plastiden-Transitpeptids der plastidären Transketolase aus Kartoffel in drei Leserastern als KpnI/BamHI Fragmente mit einem ATG-Codon in der NcoI Schnittstelle:
- 15 pTP09  
KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGGGA
- 20 TCC\_BamHI
- pTP10  
KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA
- 25 ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGCTG  
GATCC\_BamHI
- pTP11
- 30 KpnI\_GGTACCATGGCGTCTTCTTCTTCTCTCACTCTCTCTCAAGCTATCCTCTCTCGTTCTGTC  
CCTCGCCATGGCTCTGCCTCTTCTTCTCAACTTTCCCCTTCTTCTCTCACTTTTTCCGGCCTTAA  
ATCCAATCCCAATATCACCACCTCCCGCCGCCGTACTCCTTCCTCCGCCGCCGCCGCCGCCGTCG  
TAAGGTCACCGGCGATTTCGTGCCTCAGCTGCAACCGAAACCATAGAGAAAACCTGAGACTGCGGGG  
ATCC\_BamHI
- 35 Die inserierte Nukleotid-Sequenz kodierend für eine DOXS bzw. HPPD kann synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten, sowie aus verschiedenen heterologen DOXS bzw.
- 40 HPPD-Genabschnitten verschiedener Organismen bestehen. Im allgemeinen werden synthetische Nukleotid-Sequenzen mit Kodons erzeugt, die von Pflanzen bevorzugt werden. Diese von Pflanzen bevorzugten Kodons können aus Kodons mit der höchsten Proteinhäufigkeit bestimmt werden, die in den meisten interessanten Pflanzen-
- 45 zenspezies exprimiert werden. Bei der Präparation einer Expressionskassette können verschiedene DNA-Fragmente manipuliert werden, um eine Nukleotid-Sequenz zu erhalten, die zweckmäßiger-

M 23.10.99  
10

weise in der korrekten Richtung liest und die mit einem korrekten Leseraster ausgestattet ist. Für die Verbindung der DNA-Fragmente miteinander können an die Fragmente Adaptoren oder Linker angesetzt werden.

5

Zweckmäßigerweise können die Promotor- und die Terminator-Regionen in Transkriptionsrichtung mit einem Linker oder Polylinker, der eine oder mehrere Restriktionsstellen für die Insertion dieser Sequenz enthält, versehen werden. In der Regel hat der Linker 1 bis 10, meistens 1 bis 8, vorzugsweise 2 bis 6 Restriktionsstellen. Im allgemeinen hat der Linker innerhalb der regulatorischen Bereiche eine Größe von weniger als 100 bp, häufig weniger als 60 bp, mindestens jedoch 5 bp. Der Promotor kann sowohl nativ bzw. homolog als auch fremdartig bzw. heterolog zur Wirtspflanze sein. Die Expressionskassette beinhaltet in der 5'-3'-Transkriptionsrichtung den Promotor, eine DNA-Sequenz die für ein DOXS- bzw. HPPD-Gen codiert und eine Region für die transkriptionale Termination. Verschiedene Terminationsbereiche sind gegeneinander beliebig austauschbar.

20

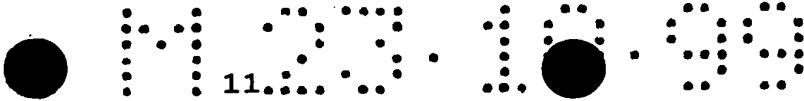
Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen bereitstellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen wie z.B. Transitionen und Transversionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "primerrepair", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Bei geeigneten Manipulationen, wie z.B. Restriktion, "chewing-back" oder Auffüllen von Überhängen für "bluntends", können komplementäre Enden der Fragmente für die Ligation zur Verfügung gestellt werden.

30

Von Bedeutung für den erfindungsgemäßen Erfolg kann u.a. das Anhängen des spezifischen ER-Retentionssignals SEKDEL sein (Schouten, A. et al., Plant Mol. Biol. 30 (1996), 781 - 792), die durchschnittliche Expressionshöhe wird damit verdreifacht bis vervierfacht. Es können auch andere Retentionssignale, die natürlicherweise bei im ER lokalisierten pflanzlichen und tierischen Proteinen vorkommen, für den Aufbau der Kassette eingesetzt werden.

40 Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind pflanzliche Polyadenylierungssignale, vorzugsweise solche, die im wesentlichen T-DNA-Polyadenylierungssignale aus *Agrobacterium tumefaciens*, insbesondere des Gens 3 der T-DNA (Octopin Synthase) des Ti-Plasmids pTiACH5 entsprechen (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835 ff)

45 oder funktionelle Äquivalente.



11.23.10.99

Eine Expressionskassette kann beispielsweise einen konstitutiven Promotor (bevorzugt den CaMV 35 S-Promotor), das LeB4-Signalpeptid, das zu exprimierende Gen und das ER-Retentionssignal enthalten. Als ER-Retentionssignal wird bevorzugt die Aminosäuresequenz KDEL (Lysin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Leucin) verwendet.

Vorzugsweise wird die fusionierte Expressionskassette, die für ein DOXS-Gen und ein HPPD-Gen kodiert, in einen Vektor, beispielsweise pBin19, kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren. Mit einem solchen Vektor transformierte Agrobakterien können dann in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie z.B. von Tabakpflanzen, verwendet werden, indem beispielsweise verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden. Die Transformation von Pflanzen durch Agrobakterien ist unter anderem bekannt aus F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15 - 38. Aus den transformierten Zellen der verwundeten Blätter bzw. Blattstücke können in bekannter Weise transgene Pflanzen regeneriert werden, die ein in die Expressionskassette integriertes Gen für die Expression eines DOXS-Gens bzw. eines HPPD-Gens enthalten.

Zur Transformation einer Wirtspflanze mit einer für eine DOXS und HPPD kodierenden DNA wird eine Expressionskassette als Insertion in einen rekombinanten Vektor eingebaut, dessen Vektor-DNA zusätzliche funktionelle Regulationssignale, beispielsweise Sequenzen für Replikation oder Integration enthält. Geeignete Vektoren sind unter anderem in "Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology" (CRC Press), Kap. 6/7, S. 71 - 119 (1993) beschrieben.

Unter Verwendung der oben zitierten Rekombinations- und Klonierungstechniken können die Expressionskassetten in geeignete Vektoren kloniert werden, die ihre Vermehrung, beispielsweise in E. coli, ermöglichen. Geeignete Klonierungsvektoren sind u.a. pBR332, pUC-Serien, M13mp-Serien und pACYC184. Besonders geeignet sind binäre Vektoren, die sowohl in E. coli als auch in Agrobakterien replizieren können.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft die Verwendung einer Expressionskassette enthaltend DNA-Sequenzen SEQ ID No. 1 und SEQ ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Transformation von Pflanzen, -zellen, -geweben oder Pflanzenteilen. Vorzugsweise ist Ziel der Verwendung die Erhöhung des

M 23.10.99

Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und Carotinoid-Gehaltes der Pflanze.

- Dabei kann je nach Wahl des Promotors die Expression spezifisch
- 5 in den Blättern, in den Samen oder anderen Teilen der Pflanze erfolgen. Solche transgenen Pflanzen, deren Vermehrungsgut, sowie deren Pflanzenzellen, -gewebe oder -teile sind ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung.
- 10 Die Expressionskassette kann darüberhinaus auch zur Transformation von Bakterien, Cyanobakterien, Hefen, filamentösen Pilzen und Algen mit dem Ziel einer Erhöhung der Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Produktion eingesetzt werden.
- 15 Die Übertragung von Fremdgenen in das Genom einer Pflanze wird als Transformation bezeichnet. Es werden dabei die beschriebenen Methoden zur Transformation und Regeneration von Pflanzen aus Pflanzengeweben oder Pflanzenzellen zur transienten oder stabilen
- 20 Transformation genutzt. Geeignete Methoden sind die Protoplastentransformation durch Polyethylenglykol-induzierte DNA-Aufnahme, das biolistische Verfahren mit der Genkanone - die sogenannte particle bombardment Methode, die Elektroporation, die Inkubation trockener Embryonen in DNA-haltiger Lösung, die Mikroinjektion
- 25 und der durch Agrobacterium vermittelte Gentransfer. Die genannten Verfahren sind beispielsweise in B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Vol. 1, Engineering and Utilization, herausgegeben von S.D. Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128 - 143 sowie in Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205 - 225) beschrieben.
- 30 Vorzugsweise wird das zu exprimierende Konstrukt in einen Vektor kloniert, der geeignet ist, Agrobacterium tumefaciens zu transformieren, beispielsweise pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711).
- 35 Mit einer Expressionskassette transformierte Agrobakterien können ebenfalls in bekannter Weise zur Transformation von Pflanzen, insbesondere von Kulturpflanzen, wie Getreide, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf,
- 40 Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und den verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies, verwendet werden, z.B. indem verwundete Blätter oder Blattstücke in einer Agrobakterienlösung gebadet und anschließend in geeigneten Medien kultiviert werden.
- 45 Funktionell äquivalente Sequenzen, die für ein DOXS-Gen bzw. HPPD-Gen kodieren, sind solche Sequenzen, welche trotz abweichender Nukleotidsequenz noch die gewünschten Funktionen besitzen.

Funktionelle Äquivalente umfassen somit natürlich vorkommende Varianten der hierin beschriebenen Sequenzen sowie künstliche, z.B. durch chemische Synthese erhaltene, an den Kodon-Gebrauch einer Pflanze angepaßte, künstliche Nukleotid-Sequenzen.

5

Unter einem funktionellen Äquivalent versteht man insbesondere auch natürliche oder künstliche Mutationen einer ursprünglich isolierten für eine DOXS bzw. HPPD kodierende Sequenz, welche weiterhin die gewünschte Funktion zeigen. Mutationen umfassen

10 Substitutionen, Additionen, Deletionen, Vertauschungen oder Insertionen eines oder mehrerer Nukleotidreste. Somit werden beispielsweise auch solche Nukleotidsequenzen durch die vorliegende Erfindung mit umfaßt, welche man durch Modifikation der DOXS- bzw. HPPD-Nukleotidsequenz erhält. Ziel einer solchen Modifikation kann z.B. die weitere Eingrenzung der darin enthaltenen

15 kodierenden Sequenz oder z.B. auch die Einfügung weiterer Restriktionsenzym-Schnittstellen sein.

Funktionelle Äquivalente sind auch solche Varianten, deren Funktion, verglichen mit dem Ausgangsgen bzw. Genfragment, abgeschwächt oder verstärkt ist.

20

Außerdem sind artifizielle DNA-Sequenzen geeignet, solange sie, wie oben beschrieben, die gewünschte Eigenschaft beispielsweise

25 der Erhöhung des Tocopherol-Gehaltes in der Pflanze durch Überexpression des DOXS- und des HPPD-Gens in Kulturpflanzen vermitteln. Solche artifiziellen DNA-Sequenzen können beispielsweise durch Rückübersetzung mittels Molecular Modelling konstruierter Proteine, die DOXS- bzw. HPPD-Aktivität aufweisen oder durch in

30 vitro-Selektion ermittelt werden. Besonders geeignet sind kodierende DNA-Sequenzen, die durch Rückübersetzung einer Polypeptidsequenz gemäß der für die Wirtspflanze spezifischen Kodon-Nutzung erhalten wurden. Die spezifische Kodon-Nutzung kann ein mit pflanzen genetischen Methoden vertrauter Fachmann durch Computerauswertungen anderer, bekannter Gene der zu transformierenden

35 Pflanze leicht ermitteln.

Als weitere geeignete äquivalente Nukleinsäure-Sequenzen sind zu nennen Sequenzen, welche für Fusionsproteine kodieren, wobei

40 Bestandteil des Fusionsproteins ein DOXS- bzw. HPPD-Polypeptid oder ein funktionell äquivalenter Teil davon ist. Der zweite Teil des Fusionsproteins kann z.B. ein weiteres Polypeptid mit enzymatischer Aktivität sein oder eine antigene Polypeptidsequenz mit deren Hilfe ein Nachweis auf DOXS- bzw. HPPD-Expression möglich

45 ist (z.B. myc-tag oder his-tag). Bevorzugt handelt es sich dabei jedoch um eine regulative Proteinsequenz, wie z.B. ein Signal-

oder Transitpeptid, das das DOXS- bzw. HPPD-Protein an den gewünschten Wirkort leitet.

Erhöhung des Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehaltes bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung die künstlich erworbene Fähigkeit einer erhöhten Biosyntheseleistung dieser Verbindungen durch funktionelle Überexpression des DOXS- und des HPPD-Gens in der Pflanze gegenüber der nicht gentechnisch modifizierten Pflanze für die Dauer mindestens einer Pflanzengeneration.

Der Biosyntheseort von Tocopherol ist im allgemeinen das Blattgewebe, so daß eine blattspezifische Expression des DOXS- und des HPPD-Gens sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, daß die Tocopherol-Biosynthese nicht auf das Blattgewebe beschränkt sein muß, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in fetthaltigen Samen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Darüberhinaus ist eine konstitutive Expression des exogenen DOXS- und des HPPD-Gens von Vorteil. Andererseits kann aber auch eine induzierbare Expression wünschenswert erscheinen.

Die Wirksamkeit der Expression des transgen exprimierten DOXS- und HPPD-Gens kann beispielsweise *in vitro* durch Sproßmeristemvermehrung ermittelt werden. Zudem kann eine in Art und Höhe veränderte Expression des DOXS und des HPPD-Gens und deren Auswirkung auf die Tocopherol-Biosyntheseleistung an Testpflanzen in Gewächshausversuchen getestet werden.

Gegenstand der Erfindung sind außerdem transgene Pflanzen, transformiert mit einer Expressionskassette enthaltend die Sequenz SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen, sowie transgene Zellen, Gewebe, Teile und Vermehrungsgut solcher Pflanzen. Besonders bevorzugt sind dabei transgene Kulturpflanzen, wie z.B. Gerste, Weizen, Roggen, Mais, Hafer, Soja, Reis, Baumwolle, Zuckerrübe, Canola, Sonnenblume, Flachs, Hanf, Kartoffel, Tabak, Tomate, Raps, Alfalfa, Salat und die verschiedenen Baum-, Nuß- und Weinspezies.

Pflanzen im Sinne der Erfindung sind mono- und dikotyle Pflanzen oder Algen.

Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 1 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS erreicht werden. Die derart herge-

stellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Durch Überexpression der für eine HPPD kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der HPPD erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

10 Durch Überexpression der für eine DOXS kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 1 und einer für die HPPD kodierenden Gensequenz SEQ ID NO: 3 in einer Pflanze kann prinzipiell eine erhöhte Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS und der HPPD erreicht werden. Die derart hergestellten transgenen Pflanzen sind ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind:

- 20 - Verfahren zur Transformation einer Pflanze dadurch gekennzeichnet, daß man Expressionskassetten enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen in eine Pflanzenzelle, in Kallusgewebe, eine ganze Pflanze oder Protoplasten von Pflanzen einbringt.
- 25 - Verwendung der Expressionskassette enthaltend eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und eine DNA-Sequenz SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Resistenz gegenüber Inhibitoren der DOXS und HPPD durch verstärkte Expression der DNA-Sequenzen SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA Sequenzen.
- 30 - Verwendung der DNA-Sequenz SEQ-ID No. 1 und SEQ-ID No. 3 oder mit diesen hybridisierende DNA-Sequenzen zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhtem Tocopherol-, Vitamin K-, Chlorophyll- und/oder Carotinoid-Gehalt durch Expression einer DOXS und einer HPPD DNA-Sequenz in Pflanzen.

40 Die Erfindung wird durch die nun folgenden Beispiele erläutert, ist aber nicht auf diese beschränkt:

#### Allgemeine Klonierungsverfahren

45 Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung durchgeführten Klonierungsschritte wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von

Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylonmembranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *E. coli* Zellen, Anzucht von Bakterien, Vermehrung von Phagen und Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press; ISBN 0-87969-309-6 beschrieben durchgeführt.

Die im folgenden verwendeten Bakterienstämme (*E. coli*, XL-I Blue) wurden von Stratagene bezogen. Der zur Pflanzentransformation verwendete Agrobakterienstamm (*Agrobacterium tumefaciens*, C58C1 mit dem Plasmid pGV2260 oder pGV3850kann) wurde von Deblaere et al. in Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777 beschrieben. Alternativ können auch der Agrobakterienstamm LBA4404 (Clontech) oder andere geeignete Stämme eingesetzt werden. Zur Klonierung können die Vektoren pUC19 (Yanish-Perron, Gene 33 (1985), 103 - 119) pBluescript SK- (Stratagene), pGEM-T (Promega), pZero (Invitrogen), pBin19 (Bevan et al., Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711 - 8720) und pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Science 66 (1990), 221 - 230) benutzt werden.

20

#### Sequenzanalyse rekombinanter DNA

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma Licor (Vertrieb durch MWG Biotech, Ebersbach) nach der Methode von Sanger (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74 (1977), 5463 - 5467).

#### Beispiel 1

Isolierung genomischer DNA des Bakteriums *Escherichia coli* XL1 Blue

Eine Kultur von *Escherichia coli* XL1 Blue wurde in 300 ml Luria Broth-Medium für 12 Stunden bei 37°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 Umdrehungen in einer Sorvall RC50-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen der Ursprungskultur Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5% SDS; 50 mM Tris HCl, pH 8,0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70 Grad 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausge-

schüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschliessend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

## 5 Beispiel 2

### Isolierung der DOXS aus E. coli

Von der DNA-Sequenz der DOXS (Acc. Number AF035440) wurden für  
10 eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI  
und am 3'-Ende eine XbaI bzw. eine weitere BamHI Restriktions-  
schnittstelle angefügt wurde. Das Oligonukleotid am 5' Ende um-  
faßt die Sequenz 5'-ATGGATCCATGAGTTTT-GATATTGCCAAATAC-3'  
(Nukleotide 1-24 der DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend  
15 mit dem ATG-Startcodon des Gens, das Oligonukleotid am 3'-Ende  
umfaßt die Sequenz 5'-ATTCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' bzw. 5'-ATG-  
GATCCTTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers kom-  
plementären DNA-Sequenz; kursiv geschrieben) beginnend mit dem  
Stop-Kodon des Gens. Die PCR-Reaktion mit den beiden BamHI ent-  
20 haltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit der Pfu-  
Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben.  
Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus E. coli einge-  
setzt. Das PCR-Programm lautete:

25 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C;  
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 48°C, 2 min 72°C;  
25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 44°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden)  
30 gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script  
(Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Se-  
quenz wurde durch Sequenzierung festgestellt. Das Fragment wurde  
BamHI aus dem PCR-Script-Vektor isoliert und in einen ent-  
sprechend geschnittenen Bin19-Vektor ligiert, der zusätzlich das  
35 Transitpeptid der Transketolase aus Kartoffel hinter dem CaMV 35S  
Promotor enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre  
Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 3 und 4 darge-  
stellt und die Fragmente haben die folgende Bedeutung:

40 Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-  
Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Vi-  
rus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Trans-  
ketolase. Fragment E beinhaltet das Gen der DOXS. Fragment D (192  
bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des  
45 Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptions-ter-  
mination.

Die PCR-Reaktion mit den 5'-BamHI und 3'-XbaI enthaltenden Oligonukleotiden wurde durchgeführt mit Taq-Polymerase (Takara, Sosei Co., Ltd.) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 500 ng der genomischen DNA aus *E. coli* eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

5

5 Zyklen: 4 sec 94°C, 4 sec 50°C, 2 min 30°C  
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 46°C, 2 min 68°C  
25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 42°C, 2 min 68°C

- 10 Das Fragment wurde mit dem Gene-Clean-Kit gereinigt und in den Vektor pGemT (Promega GmbH, Mannheim) ligiert. Es wurde als BamHI/XbaI-Fragment in einen entsprechend geschnittenen pBin19AR-Vektor hinter den CaMV 35S Promotor kloniert. Die Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft ( SEQ-ID No. 1 ). Dabei wurden zwei
- 15 nicht konservative Basenaustausche festgestellt, die im Vergleich zur veröffentlichten Sequenz zur Veränderung der Aminosäure 152 (Asparagin) in Valin und Aminosäure 330 (Cystein) in Tryptophan führen.

## 20 Beispiel 3

Klonierung des Gens einer HPPD aus *Streptomyces avermitilis* U11864

- 25 Isolierung genomischer DNA des Bakteriums *Streptomyces avermitilis* U11864:

- Eine Kultur von *Streptomyces avermitilis* U11864 wurde in 300 ml YEME-Medium (5 g Malz-Extrakt, 2 g Hefe-Extrakt, 2 g Glukose) für
- 30 96 h bei 28°C angezogen. Aus dieser Kultur wurde die genomische DNA des Bakteriums isoliert, indem diese zunächst bei 5000 U in einer Sorvall RC5C-Fuge pelletiert wurde. Anschliessend wurde das Pellet in 1/30 Volumen Lysis-Puffer (25 mM EDTA, 0,5 % SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) resuspendiert. Ein gleiches Volumen Phenol/
- 35 Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde zugegeben und bei 70°C 10 Minuten inkubiert. Anschliessend wurde in einer Heraeus Untertisch-Zentrifuge bei 3500 U 15 Minuten die wässrige Phase von der phenolischen getrennt. Der wässrige Überstand wurde mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 8 M Lithiumchlorid versetzt und die
- 40 Nukleinsäuren bei Raumtemperatur für 10 Minuten gefällt. Das Pellet wurde anschliessend in 400 µl TE/RNase aufgenommen und bei 37 Grad für 10 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde erneut mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und der Überstand gefällt mit 2,5 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen
- 45 8 M Lithiumchlorid. Das Pellet wurde anschließend mit 80% Ethanol gewaschen und in 400 µl TE/RNase aufgenommen.

Von der DNA-Sequenz der HPPD aus *Streptomyces avermitilis* (Denoya et al, 1994; Acc. Number U11864) wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende eine BamHI und am 3'-Ende eine XbaI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das

- 5 Oligonukleotid am 5'-Ende umfasst die Sequenz 5'-GGATCCAGCGGA-CAAGCCAAC-3' (37 bis 55 Basen vom ATG in 5'-Richtung entfernt; kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-TCTAGATTATGCCAGCCAGGCCTTG-3' (Nukleotide 1845-1863 der revers komplementären DNA-Sequenz; Kursiv geschrieben).

10

Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Pfu-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) nach Herstellerangaben. Als Vorlage wurden 400 ng der genomischen DNA eingesetzt. Das PCR-Programm lautete:

- 15 5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 54°C, 2 min 72°C  
5 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 52°C, 2 min 72°C  
25 Zyklen: 4 sec 94°C, 30 sec 50°C, 2 min 72°C

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden)

- 20 gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Dabei wurde festgestellt, daß das isolierte Gen für eine zusätzliche Aminosäure kodiert. Es enthält die drei Basen TAC (kodierend für Tyrosin),  
25 vor dem Nukleotid N429 der zitierten Sequenz (Denoya et al., 1994).

Das Fragment wurde mit einem BamHI und XbaI Verdau aus dem Vektor isoliert und in einen entsprechend geschnittenen Bin19AR-Vektor

- 30 hinter den CaMV 35S Promotor ligiert, zur Expression des Gens im Zytosol. Aus dem gleichen PCR-Script-Vektor wurde das Gen als BamHI-Fragment isoliert und in einen entsprechend geschnittenen pBin19-Vektor ligiert, der hinter dem CaMV 35S Promotor noch zusätzlich das Transitpeptid der plastidären Transketolase aus  
35 Kartoffel enthält. Das Transitpeptid gewährleistet die plastidäre Lokalisierung. Die Konstrukte sind in Abbildung 5 und 6 dargestellt und die Fragmente haben folgende Bedeutung:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437 des Cauliflower-Mosaik-Virus). Fragment B (259 bp) beinhaltet das Transitpeptid der Transketolase. Fragment C beinhaltet das Gen der HPPD. Fragment D (192 bp) enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen, J. et al., EMBO J. 3 (1984),

- 45 835-846) zur Transkriptionstermination.

## Beispiel 4

Herstellung von Konstrukten zur Pflanzentransformation mit DOXS und HPPD-DNA-Sequenzen

5

Zur Herstellung von Pflanzen, welche transgen für die DOXS und die HPPD sind, wurde ein binärer Vektor angefertigt, der beide Gensequenzen enthält (Abbildung 7). Die Gensequenzen der DOXS und der HPPD wurden jeweils als BamHI-Fragmente wie in Beispiel 2 und 10 3 beschrieben kloniert. Der Vektor pBinAR-Hyg enthält den 35S-Promotor des Blumenkohlmosaikvirus und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination. Der pBinAR-Hyg Vektor vermittelt in Pflanzen Resistenz gegen das Antibiotikum Hygromycin 15 und ist so geeignet, Pflanzen mit Kanamycinresistenz zu superinfizieren.

Zur Klonierung der HPPD in Vektoren, welche zusätzlich noch eine andere cDNA enthalten, wurden für eine PCR Oligonukleotide abgeleitet, denen am 5'-Ende und am 3'-Ende eine BamHI Restriktionsschnittstelle angefügt worden war. Das Oligonukleotid am 5'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-GGATCCTCCAGCGGACAAGCCAAC-3' (Nukleotide 37 bis 55 vom ATG in 5'-Richtung entfernt; Kursiv geschrieben), das Oligonukleotid am 3'-Ende umfaßt die Sequenz 5'-ATGGATC- 25 CCGCGCCGCCTACAGGTTG-3' (endend mit Basenpaar 1140 der kodierenden Sequenz, beginnend 8 Basenpaare 3' des TAG Stop-Codons; Kursiv geschrieben). Die PCR-Reaktion wurde durchgeführt mit Tli-Polymerase (Promega GmbH, Mannheim) nach Herstellerangaben. Als Template wurden 10 ng des Plasmids pBinAR-HPPD eingesetzt. Das 30 PCR-Programm lautete:

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 68°C 30 sec, 72°C 2 min

5 Zyklen: 94°C 4 sec, 64°C 30 sec, 72°C 2 min

25 Zyklen: 94°C 4 sec, 60°C 30 sec, 72°C 2 min

35

Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft. Aus dem Vektor PCR- 40 Script wurde es als BamHI-Fragment ausgeschnitten und in einen entsprechend geschnittenen pBinAR-Vektor ligiert, der zusätzlich das Transitpeptid der Transketolase enthält, zur Einführung des Genprodukts in den Plastiden. Es entstand das Plasmid pBinAR2-TP-HPPD (Abbildung 6).

45

- Zur Klonierung wurde aus dem Plasmid pBinAR2-TP-HPPD der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das HPPD-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination
- 5 mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und den Terminator wurde jeweils eine HindIII-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den 5'-Bereich des Promotors (kursiv geschrieben) anlagert, lautet 5'-ATAAGCTT-CATGGAGTCAAA-GATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches
- 10 sich an die Terminationssequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATAAGCTTGGACAATCAGTAAATTGAACGGAG-3'. Das erhaltene Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der
- 15 Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft ( SEQ-ID No. 3 ). Aus diesem PCR-Script-Vektor wurde es als HindIII-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984, Nucleic Acids Res. 12, 8711-8721) übertragen.
- 20 Aus dem Plasmid pBinAR-TP-DOXS wurde der 35S-Promotor, das Transketolase-Transitpeptid, das DOXS-Gen und das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination mittels PCR isoliert. Den Oligonukleotiden für den Promotor und die Terminatorsequenz wurde
- 25 jeweils eine EcoRI-Schnittstelle angefügt. Die Sequenz des Oligonukleotids, welches sich an den Promotor (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCCATGGAGTCAAAGATTCAAATAGA-3', die des Oligonukleotids, welches sich an die Terminatorsequenz (kursiv geschrieben) anlagert lautet 5'-ATGAATTCGGACAATCAGTAAATTGAA-CGGA-
- 30 G-3'. Das Fragment wurde mittels Gene-Clean-Kit (Dianova GmbH, Hilden) gereinigt und nach Herstellerangaben in den Vektor PCR-Script (Stratagene GmbH, Heidelberg) kloniert. Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung überprüft ( SEQ-ID No. 1 ). Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als EcoRI-Fragment in den ent-
- 35 sprechend geschnittenen Vektor pBin19 (Bevan, 1984) übertragen.

Aus dem PCR-Script Vektor wurde es als XbaI-Fragment in den entsprechend geschnittenen Vektor übertragen, der wie oben beschrieben bereits die Sequenz der HPPD enthielt. Es entstand

40 das Konstrukt pBinAR-HPPD-DOXS (Abbildung 7), dessen Fragmente folgende Bedeutung haben:

Fragment A (529 bp) beinhaltet den 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Nukleotide 6909 bis 7437). Fragment B enthält das

45 Transitpeptid der plastidären Transketolase. Fragment C enthält das Gen der HPPD. Fragment D enthält das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al.,

1984) zur Transkriptionstermination. Fragment E enthält das Gen der DOXS.

#### Beispiel 5

5

Herstellung von transgenen Tabakpflanzen  
(*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun NN)

- Für die Herstellung transgener Tabakpflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, wurden Tabakblattscheiben mit Sequenzen der DOXS und der HPPD transformiert. Zur Transformation von Tabakpflanzen wurden 10 ml einer unter Selektion gewachsenen Übernachtskultur von *Agrobacterium tumefaciens* abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Bakterien in gleichem Volumen Antibiotika-freien Mediums resuspendiert. In einer sterilen Petrischale wurden Blattscheiben steriler Pflanzen (Durchmesser ca. 1 cm) in dieser Bakteriensuspension gebadet. Anschließend wurden die Blattscheiben in Petrischalen auf MS-Medium (Murashige und Skoog, *Physiol. Plant* (1962) 15, 473) mit 2% Saccharose und 0.8% Bacto-Agar ausgelegt. Nach 2-tägiger Inkubation im Dunkeln bei 25°C wurden sie auf MS-Medium mit 100mg/l Kanamycin, 500mg/l Claforan, 1mg/l Benzylaminopurin (BAP), 0.2mg/l Naphtylelessigsäure (NAA), 1.6% Glukose und 0.8% Bacto-Agar übertragen und die Kultivierung (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit) fortgesetzt.
- 25 Wachsende Sprosse wurden auf hormonfreies MS-Medium mit 2% Saccharose, 250mg/l Claforan und 0.8% Bacto-Agar überführt.

#### Beispiel 6

- 30 Herstellung von transgenen Rapspflanzen (*Brassica napus*)

Die Herstellung der transgenen Rapspflanzen, die einen veränderten Prenyllipidgehalt aufweisen, orientierte sich an einem Protokoll von Bade, J.B. und Damm, B. (in *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38), in welchem auch die Zusammensetzungen der verwendeten Medien und Puffer angegeben sind.

- Die Transformationen erfolgten mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Stamm LBA4404 (Clontech GmbH, Heidelberg). Als binäre Vektoren wurden die bereits oben beschriebenen binären Konstrukte mit den gesamten cDNAs der DOXS und der HPPD verwendet. In allen hier verwendeten binären Vektoren wurde die NOS-Terminatorsequenz durch das Polyadenylierungssignal des Gens 3 der T-DNA des Ti-Plasmids pTIACH5 (Gielen et al., 1984) zur Transkriptionstermination ersetzt. *Brassica napus* Samen wurden mit 70% (v/v) Ethanol oberflächensteril gemacht, 10 min bei 55°C in H<sub>2</sub>O gewaschen, in

1%iger Hypochlorit-Lösung (25% v/v Teepol, 0,1% v/v Tween 20) für 20 min inkubiert und sechsmal mit sterilem H<sub>2</sub>O für jeweils 20 min gewaschen. Die Samen wurden drei Tage auf Filterpapier getrocknet und 10-15 Samen in einem Glasskolben mit 15 ml Keimungsmedium zur Keimung gebracht. Von mehreren Keimlingen (ca. 10 cm groß) wurden die Wurzeln und Apices entfernt und die verbleibenden Hypokotyle in ca. 6 mm lange Stücke geschnitten. Die so gewonnenen ca. 600 Explante werden 30 min mit 50 ml Basalmedium gewaschen und in einen 300 ml Kolben überführt. Nach Zugabe von 100 ml Kallus-Induktionsmedium wurden die Kulturen für 24 h bei 100 U/min inkubiert.

Vom Agrobacterium-Stamm wurde eine Übernachtskultur bei 29°C in Luria Broth-Medium mit Kanamycin (20 mg/l) angesetzt, davon 2 ml in 50 ml Luria Broth-Medium ohne Kanamycin für 4 h bei 29°C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,5 inkubiert. Nach der Pelletierung der Kultur bei 2000 U/min für 25 min wurde das Zellpellet in 25 ml Basalmedium resuspendiert. Die Konzentration der Bakterien in der Lösung wurde durch Zugabe von weiterem Basalmedium auf eine OD<sub>600</sub> von 0.3 eingestellt.

Aus den Raps-Explanten wurde das Kallus-Induktionsmedium mit sterilen Pipetten entfernt, 50 ml Agrobacterium-Lösung hinzugefügt, vorsichtig gemischt und für 20 min inkubiert. Die Agrobacterien-Suspension wurde entfernt, die Raps-Explante für 1 min mit 50 ml Kallus-Induktionsmedium gewaschen und anschließend 100 ml Kallus-Induktionsmedium hinzugefügt. Die Co-Kultivierung wurde für 24 h auf einem Rotationsschüttler bei 100 U/min durchgeführt. Die Co-Kultivierung wurde durch Wegnahme des Kallus-Induktionsmediums gestoppt und die Explante zweimal für jeweils 1 min mit 25 ml und zweimal für 60 min mit jeweils 100 ml Waschmedium bei 100 U/min gewaschen. Das Waschmedium mit den Explanten wurde in 15 cm Petrischalen überführt und das Medium mit sterilen Pipetten entfernt.

Zur Regeneration wurden jeweils 20-30 Explante in 90 mm Petrischalen überführt, welche 25 ml Sproß-Induktionsmedium mit Kanamycin enthielten. Die Petrischalen wurden mit 2 Lagen Leukopor verschlossen und bei 25°C und 2000 lux bei Photoperioden von 16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit inkubiert. Alle 12 Tage wurden die sich entwickelnden Kalli auf frische Petrischalen mit Sproß-Induktionsmedium überführt. Alle weiteren Schritte zur Regeneration ganzer Pflanzen wurde wie von Bade, J.B. und Damm, B. (in Gene Transfer to Plants, Potrykus, I. und Spangenberg, G., eds, Springer Lab Manual, Springer Verlag, 1995, 30-38) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 7

## Steigerung der Tocopherolbiosynthese in Raps

- 5 Die cDNA der DOXS und der HPPD wurde mit einem CaMV35S-Promotor versehen und in Raps unter Verwendung des 35S-Promotors überexprimiert. Parallel dazu wurde der samenspezifische Promotor des Phaseolingenens verwendet, um den Tocopherolgehalt spezifisch im Rapssamen zu erhöhen. Mit den entsprechenden Konstrukten trans-
- 10 formierte Rapspflanzen wurden im Gewächshaus angezogen. Anschließend wurde der  $\alpha$ -Tocopherolgehalt der Gesamtpflanze bzw. der Samen der Pflanze bestimmt. In allen Fällen war die  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration im Vergleich zur nicht transformierten Pflanze erhöht.

15

20

25

30

35

40

45

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALGEMEINE INFORMATION:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: BASF AG
- (B) STRASSE: Carl-Bosch
- (C) ORT: Ludwigshafen
- (E) LAND: Germany
- (F) POSTLEITZAHL: 67056
- (G) TELEPHON: 0621-60-52698
- (H) TELEFAX: 0621-60-48821

(ii) ANMELDETITEL: DNA-Sequenz codierend fuer eine DOXS und eine HPPD und deren Ueberproduktion in Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

## (iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1863 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

## (vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase
- (B) STAMM: E.coli XL1 Blue

## (ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 1..1863

## (x) VERÖFFENTLICHUNGSIONFORMATION:

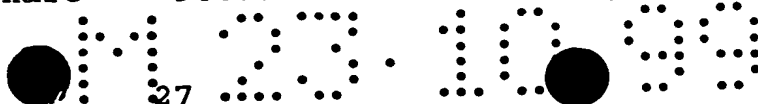
- (A) AUTORS: Reindl, Andreas
- (G) DATUM: 2000

(K) BELANGREICHE RESTE IN SEQ ID NO: 1: VON 1 BIS

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

ATG	AGT	TTT	GAT	ATT	GCC	AAA	TAC	CCG	ACC	CTG	GCA	CTG	GTC	GAC	TCC	48
Met	Ser	Phe	Asp	Ile	Ala	Lys	Tyr	Pro	Thr	Leu	Ala	Leu	Val	Asp	Ser	
1				5				10					15			
ACC	CAG	GAG	TTA	CGA	CTG	TTG	CCG	AAA	GAG	AGT	TTA	CCG	AAA	CTC	TGC	96
Thr	Gln	Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Pro	Lys	Glu	Ser	Leu	Pro	Lys	Leu	Cys	
				20				25							30	

GAC	GAA	CTG	CGC	CGC	TAT	TTA	CTC	GAC	AGC	GTG	AGC	CGT	TCC	AGC	GGG	144
Asp	Glu	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Ser	Arg	Ser	Ser	Gly	
		35					40					45				
CAC	TTC	GCC	TCC	GGG	CTG	GGC	ACG	GTC	GAA	CTG	ACC	GTG	GCG	CTG	CAC	192
His	Phe	Ala	Ser	Gly	Leu	Gly	Thr	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Ala	Leu	His	
		50				55					60					
TAT	GTC	TAC	AAC	ACC	CCG	TTT	GAC	CAA	TTG	ATT	TGG	GAT	GTG	GGG	CAT	240
Tyr	Val	Tyr	Asn	Thr	Pro	Phe	Asp	Gln	Leu	Ile	Trp	Asp	Val	Gly	His	
		65			70					75					80	
CAG	GCT	TAT	CCG	CAT	AAA	ATT	TTG	ACC	GGA	CGC	CGC	GAC	AAA	ATC	GGC	288
Gln	Ala	Tyr	Pro	His	Lys	Ile	Leu	Thr	Gly	Arg	Arg	Asp	Lys	Ile	Gly	
				85					90					95		
ACC	ATC	CGT	CAG	AAA	GGC	GGT	CTG	CAC	CCG	TTC	CCG	TGG	CGC	GGC	GAA	336
Thr	Ile	Arg	Gln	Lys	Gly	Gly	Leu	His	Pro	Phe	Pro	Trp	Arg	Gly	Glu	
			100					105						110		
AGC	GAA	TAT	GAC	GTA	TTA	AGC	GTC	GGG	CAT	TCA	TCA	ACC	TCC	ATC	AGT	384
Ser	Glu	Tyr	Asp	Val	Leu	Ser	Val	Gly	His	Ser	Ser	Thr	Ser	Ile	Ser	
		115					120					125				
GCC	GGA	ATT	GGT	ATT	GCG	GTT	GCT	GCC	GAA	AAA	GAA	GGC	AAA	AAT	CGC	432
Ala	Gly	Ile	Gly	Ile	Ala	Val	Ala	Ala	Glu	Lys	Glu	Gly	Lys	Asn	Arg	
		130				135					140					
CGC	ACC	GTC	TGT	GTC	ATT	GGC	GAT	GGC	GCG	ATT	ACC	GCA	GGC	ATG	GCG	480
Arg	Thr	Val	Cys	Val	Ile	Gly	Asp	Gly	Ala	Ile	Thr	Ala	Gly	Met	Ala	
					150				155					160		
TTT	GAA	GCG	ATG	AAT	CAC	GCG	GGC	GAT	ATC	CGT	CCT	GAT	ATG	CTG	GTG	528
Phe	Glu	Ala	Met	Asn	His	Ala	Gly	Asp	Ile	Arg	Pro	Asp	Met	Leu	Val	
				165					170					175		
ATT	CTC	AAC	GAC	AAT	GAA	ATG	TCG	ATT	TCC	GAA	AAT	GTC	GGC	GCG	CTC	576
Ile	Leu	Asn	Asp	Asn	Glu	Met	Ser	Ile	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Ala	Leu	
			180					185					190			
AAC	AAC	CAT	CTG	GCA	CAG	CTG	CTT	TCC	GGT	AAG	CTT	TAC	TCT	TCA	CTG	624
Asn	Asn	His	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ser	Leu	
		195					200					205				
CGC	GAA	GGC	GGG	AAA	AAA	GTT	TTC	TCT	GGC	GTG	CCG	CCA	ATT	AAA	GAG	672
Arg	Glu	Gly	Gly	Lys	Lys	Val	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Pro	Ile	Lys	Glu	
		210				215					220					
CTG	CTC	AAA	CGC	ACC	GAA	GAA	CAT	ATT	AAA	GGC	ATG	GTA	GTG	CCT	GGC	720
Leu	Leu	Lys	Arg	Thr	Glu	Glu	His	Ile	Lys	Gly	Met	Val	Val	Pro	Gly	
					225		230			235				240		
ACG	TTG	TTT	GAA	GAG	CTG	GGC	TTT	AAC	TAC	ATC	GGC	CCG	GTG	GAC	GGT	768
Thr	Leu	Phe	Glu	Glu	Leu	Gly	Phe	Asn	Tyr	Ile	Gly	Pro	Val	Asp	Gly	
				245				250						255		
CAC	GAT	GTG	CTG	GGG	CTT	ATC	ACC	ACG	CTA	AAG	AAC	ATG	CGC	GAC	CTG	816
His	Asp	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Arg	Asp	Leu	
			260				265					270				
AAA	GGC	CCG	CAG	TTC	CTG	CAT	ATC	ATG	ACC	AAA	AAA	GGT	CGT	GGT	TAT	864
Lys	Gly	Pro	Gln	Phe	Leu	His	Ile	Met	Thr	Lys	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr	



275	280	285	
GAA CCG GCA GAA AAA GAC CCG ATC ACT TTC CAC GCC GTG CCT AAA TTT			912
Glu Pro Ala Glu Lys Asp Pro Ile Thr Phe His Ala Val Pro Lys Phe			
290	295	300	
GAT CCC TCC AGC GGT TGT TTG CCG AAA AGT AGC GGC GGT TTG CCG AGC			960
Asp Pro Ser Ser Gly Cys Leu Pro Lys Ser Ser Gly Gly Leu Pro Ser			
305	310	315	320
TAT TCA AAA ATC TTT GGC GAC TGG TTG TGC GAA ACG GCA GCG AAA GAC			1008
Tyr Ser Lys Ile Phe Gly Asp Trp Leu Cys Glu Thr Ala Ala Lys Asp			
325	330	335	
AAC AAG CTG ATG GCG ATT ACT CCG GCG ATG CGT GAA GGT TCC GGC ATG			1056
Asn Lys Leu Met Ala Ile Thr Pro Ala Met Arg Glu Gly Ser Gly Met			
340	345	350	
GTC GAG TTT TCA CGT AAA TTC CCG GAT CGC TAC TTC GAC GTG GCA ATT			1104
Val Glu Phe Ser Arg Lys Phe Pro Asp Arg Tyr Phe Asp Val Ala Ile			
355	360	365	
GCC GAG CAA CAC GCG GTG ACC TTT GCT GCG GGT CTG GCG ATT GGT GGG			1152
Ala Glu Gln His Ala Val Thr Phe Ala Ala Gly Leu Ala Ile Gly Gly			
370	375	380	
TAC AAA CCC ATT GTC GCG ATT TAC TCC ACT TTC CTG CAA CGC GCC TAT			1200
Tyr Lys Pro Ile Val Ala Ile Tyr Ser Thr Phe Leu Gln Arg Ala Tyr			
385	390	395	400
GAT CAG GTG CTG CAT GAC GTG GCG ATT CAA AAG CTT CCG GTC CTG TTC			1248
Asp Gln Val Leu His Asp Val Ala Ile Gln Lys Leu Pro Val Leu Phe			
405	410	415	
GCC ATC GAC CGC GCG GGC ATT GTT GGT GCT GAC GGT CAA ACC CAT CAG			1296
Ala Ile Asp Arg Ala Gly Ile Val Gly Ala Asp Gly Gln Thr His Gln			
420	425	430	
GGT GCT TTT GAT CTC TCT TAC CTG CGC TGC ATA CCG GAA ATG GTC ATT			1344
Gly Ala Phe Asp Leu Ser Tyr Leu Arg Cys Ile Pro Glu Met Val Ile			
435	440	445	
ATG ACC CCG AGC GAT GAA AAC GAA TGT CGC CAG ATG CTC TAT ACC GGC			1392
Met Thr Pro Ser Asp Glu Asn Glu Cys Arg Gln Met Leu Tyr Thr Gly			
450	455	460	
TAT CAC TAT AAC GAT GGC CCG TCA GCG GTG CGC TAC CCG CGT GGC AAC			1440
Tyr His Tyr Asn Asp Gly Pro Ser Ala Val Arg Tyr Pro Arg Gly Asn			
465	470	475	480
GCG GTC GGC GTG GAA CTG ACG CCG CTG GAA AAA CTA CCA ATT GGC AAA			1488
Ala Val Gly Val Glu Leu Thr Pro Leu Glu Lys Leu Pro Ile Gly Lys			
485	490	495	
GGC ATT GTG AAG CGT CGT GGC GAG AAA CTG GCG ATC CTT AAC TTT GGT			1536
Gly Ile Val Lys Arg Arg Gly Glu Lys Leu Ala Ile Leu Asn Phe Gly			
500	505	510	
ACG CTG ATG CCA GAA GCG GCG AAA GTC GCC GAA TCG CTG AAC GCC ACG			1584
Thr Leu Met Pro Glu Ala Ala Lys Val Ala Glu Ser Leu Asn Ala Thr			
515	520	525	
CTG GTC GAT ATG CGT TTT GTG AAA CCG CTT GAT GAA GCG TTA ATT CTG			1632

Leu Val Asp Met Arg Phe Val Lys Pro Leu Asp Glu Ala Leu Ile Leu  
 530 535 540  
 GAA ATG GCC GCC AGC CAT GAA GCG CTG GTC ACC GTA GAA GAA AAC GCC 1680  
 Glu Met Ala Ala Ser His Glu Ala Leu Val Thr Val Glu Glu Asn Ala  
 545 550 555 560  
 ATT ATG GGC GGC GCA GGC AGC GGC GTG AAC GAA GTG CTG ATG GCC CAT 1728  
 Ile Met Gly Gly Ala Gly Ser Gly Val Asn Glu Val Leu Met Ala His  
 565 570 575  
 CGT AAA CCA GTA CCC GTG CTG AAC ATT GGC CTG CCG GAC TTC TTT ATT 1776  
 Arg Lys Pro Val Pro Val Leu Asn Ile Gly Leu Pro Asp Phe Phe Ile  
 580 585 590  
 CCG CAA GGA ACT CAG GAA GAA ATG CGC GCC GAA CTC GGC CTC GAT GCC 1824  
 Pro Gln Gly Thr Gln Glu Glu Met Arg Ala Glu Leu Gly Leu Asp Ala  
 595 600 605  
 GCT GGT ATG GAA GCC AAA ATC AAG GCC TGG CTG GCA TA 1863  
 Ala Gly Met Glu Ala Lys Ile Lys Ala Trp Leu Ala  
 610 615 620

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 620 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Ser Phe Asp Ile Ala Lys Tyr Pro Thr Leu Ala Leu Val Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Thr Gln Glu Leu Arg Leu Leu Pro Lys Glu Ser Leu Pro Lys Leu Cys  
 20 25 30  
 Asp Glu Leu Arg Arg Tyr Leu Leu Asp Ser Val Ser Arg Ser Ser Gly  
 35 40 45  
 His Phe Ala Ser Gly Leu Gly Thr Val Glu Leu Thr Val Ala Leu His  
 50 55 60  
 Tyr Val Tyr Asn Thr Pro Phe Asp Gln Leu Ile Trp Asp Val Gly His  
 65 70 75 80  
 Gln Ala Tyr Pro His Lys Ile Leu Thr Gly Arg Arg Asp Lys Ile Gly  
 85 90 95  
 Thr Ile Arg Gln Lys Gly Gly Leu His Pro Phe Pro Trp Arg Gly Glu  
 100 105 110  
 Ser Glu Tyr Asp Val Leu Ser Val Gly His Ser Ser Thr Ser Ile Ser  
 115 120 125  
 Ala Gly Ile Gly Ile Ala Val Ala Ala Glu Lys Glu Gly Lys Asn Arg  
 130 135 140  
 Arg Thr Val Cys Val Ile Gly Asp Gly Ala Ile Thr Ala Gly Met Ala  
 145 150 155 160  
 Phe Glu Ala Met Asn His Ala Gly Asp Ile Arg Pro Asp Met Leu Val  
 165 170 175  
 Ile Leu Asn Asp Asn Glu Met Ser Ile Ser Glu Asn Val Gly Ala Leu

M 20 10 99  
29

180										185					190				
Asn	Asn	His	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gly	Lys	Leu	Tyr	Ser	Ser	Leu				
195										200					205				
Arg	Glu	Gly	Gly	Lys	Lys	Val	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Pro	Ile	Lys	Glu				
210										215					220				
Leu	Leu	Lys	Arg	Thr	Glu	Glu	His	Ile	Lys	Gly	Met	Val	Val	Pro	Gly				
225										230					235				
Thr	Leu	Phe	Glu	Glu	Leu	Gly	Phe	Asn	Tyr	Ile	Gly	Pro	Val	Asp	Gly				
245										250					255				
His	Asp	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Thr	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Arg	Asp	Leu				
260										265					270				
Lys	Gly	Pro	Gln	Phe	Leu	His	Ile	Met	Thr	Lys	Lys	Gly	Arg	Gly	Tyr				
275										280					285				
Glu	Pro	Ala	Glu	Lys	Asp	Pro	Ile	Thr	Phe	His	Ala	Val	Pro	Lys	Phe				
290										295					300				
Asp	Pro	Ser	Ser	Gly	Cys	Leu	Pro	Lys	Ser	Ser	Gly	Gly	Leu	Pro	Ser				
305										310					315				
Tyr	Ser	Lys	Ile	Phe	Gly	Asp	Trp	Leu	Cys	Glu	Thr	Ala	Ala	Lys	Asp				
325										330					335				
Asn	Lys	Leu	Met	Ala	Ile	Thr	Pro	Ala	Met	Arg	Glu	Gly	Ser	Gly	Met				
340										345					350				
Val	Glu	Phe	Ser	Arg	Lys	Phe	Pro	Asp	Arg	Tyr	Phe	Asp	Val	Ala	Ile				
355										360					365				
Ala	Glu	Gln	His	Ala	Val	Thr	Phe	Ala	Ala	Gly	Leu	Ala	Ile	Gly	Gly				
370										375					380				
Tyr	Lys	Pro	Ile	Val	Ala	Ile	Tyr	Ser	Thr	Phe	Leu	Gln	Arg	Ala	Tyr				
385										390					395				
Asp	Gln	Val	Leu	His	Asp	Val	Ala	Ile	Gln	Lys	Leu	Pro	Val	Leu	Phe				
405										410					415				
Ala	Ile	Asp	Arg	Ala	Gly	Ile	Val	Gly	Ala	Asp	Gly	Gln	Thr	His	Gln				
420										425					430				
Gly	Ala	Phe	Asp	Leu	Ser	Tyr	Leu	Arg	Cys	Ile	Pro	Glu	Met	Val	Ile				
435										440					445				
Met	Thr	Pro	Ser	Asp	Glu	Asn	Glu	Cys	Arg	Gln	Met	Leu	Tyr	Thr	Gly				
450										455					460				
Tyr	His	Tyr	Asn	Asp	Gly	Pro	Ser	Ala	Val	Arg	Tyr	Pro	Arg	Gly	Asn				
465										470					475				
Ala	Val	Gly	Val	Glu	Leu	Thr	Pro	Leu	Glu	Lys	Leu	Pro	Ile	Gly	Lys				
485										490					495				
Gly	Ile	Val	Lys	Arg	Arg	Gly	Glu	Lys	Leu	Ala	Ile	Leu	Asn	Phe	Gly				
500										505					510				
Thr	Leu	Met	Pro	Glu	Ala	Ala	Lys	Val	Ala	Glu	Ser	Leu	Asn	Ala	Thr				
515										520					525				
Leu	Val	Asp	Met	Arg	Phe	Val	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Ala	Leu	Ile	Leu				
530										535					540				
Glu	Met	Ala	Ala	Ser	His	Glu	Ala	Leu	Val	Thr	Val	Glu	Glu	Asn	Ala				
545										550					555				
															560				

12340-99

Ile	Met	Gly	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Val	Asn	Glu	Val	Leu	Met	Ala	His
				565					570						575
Arg	Lys	Pro	Val	Pro	Val	Leu	Asn	Ile	Gly	Leu	Pro	Asp	Phe	Phe	Ile
			580					585					590		
Pro	Gln	Gly	Thr	Gln	Glu	Glu	Met	Arg	Ala	Glu	Leu	Gly	Leu	Asp	Ala
		595					600					605			
Ala	Gly	Met	Glu	Ala	Lys	Ile	Lys	Ala	Trp	Leu	Ala				
	610					615					620				

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 1469 Basenpaare  
(B) ART: Nukleinsäure  
(C) STRANGFORM: Einzel  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(v) ART DES FRAGMENTS: N-Terminus

(vi) URSPRÜNGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: 4-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase  
(B) STAMM: Streptomyces avermitilis  
(C) INDIVIDUUM ISOLAT: U11864

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS  
(B) LAGE: 218..1138

(x) VERÖFFENTLICHUNGSGEHEIMNISINFORMATION:

- (A) AUTORS: Reindl, Andreas  
(G) DATUM: 2000

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

[illegible]

11.23.10 ●

CTC	CAC	CGC	CTT	CGG	CAT	GCA	GCT	TGT	GGC	GTA	CTC	CGG	ACC	GGA	GAA	475
Leu	His	Arg	Leu	Arg	His	Ala	Ala	Cys	Gly	Val	Leu	Arg	Thr	Gly	Glu	
				75					80					85		
CGG	CAG	CCG	CGA	GAC	CGC	TTC	GTA	CGT	CCT	CAC	CAA	CGG	CTC	GGC	ACG	523
Arg	Gln	Pro	Arg	Asp	Arg	Phe	Val	Arg	Pro	His	Gln	Arg	Leu	Gly	Thr	
			90					95					100			
CTT	CGT	CCT	CAC	CTC	CGT	CAT	CAA	GCC	CGC	CAC	CCC	CTG	GGG	CCA	CTT	571
Leu	Arg	Pro	His	Leu	Arg	His	Gln	Ala	Arg	His	Pro	Leu	Gly	Pro	Leu	
		105					110					115				
CCT	CGC	CGA	CCA	TGT	GGC	CGA	GCA	CGG	CGA	CGG	CGT	CGT	CGA	CCT	CGC	619
Pro	Arg	Arg	Pro	Cys	Gly	Arg	Ala	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Arg	
		120					125					130				
CAT	CGA	GGT	CCC	GGA	CGC	CCG	CGC	CGC	CCA	CGC	GTA	CGC	GAT	CGA	GCA	667
His	Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Pro	Arg	Val	Arg	Asp	Arg	Ala	
135					140					145					150	
CGG	CGC	CCG	CTC	GGT	CGC	CGA	GCC	GTA	CGA	GCT	GAA	GGA	CGA	GCA	CGG	715
Arg	Arg	Pro	Leu	Gly	Arg	Arg	Ala	Val	Arg	Ala	Glu	Gly	Arg	Ala	Arg	
				155				160						165		
CAC	GGT	CGT	CCT	CGC	CGC	GAT	CGC	CAC	CTA	CGG	CAA	GAC	CCG	CCA	CAC	763
His	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Asp	Arg	His	Leu	Arg	Gln	Asp	Pro	Pro	His	
			170					175					180			
CCT	CGT	CGA	CCG	GAC	CGG	CTA	CGA	CGG	CCC	CTA	CCT	CCC	CGG	CTA	CGT	811
Pro	Arg	Arg	Pro	Asp	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro	Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Arg	
			185					190					195			
GGC	CGC	CGC	CCC	GAT	CGT	CGA	ACC	GCC	CGC	CCA	CCG	CAC	CTT	CCA	GGC	859
Gly	Arg	Arg	Pro	Asp	Arg	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro	Pro	His	Leu	Pro	Gly	
		200					205					210				
CAT	CGA	CCA	CTG	CGT	CGG	CAA	CGT	CGA	GCT	CGG	CCG	GAT	GAA	CGA	ATG	907
His	Arg	Pro	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Ala	Arg	Pro	Asp	Glu	Arg	Met	
215					220					225					230	
GGT	CGG	CTT	CTA	CAA	CAA	GGT	CAT	GGG	CTT	CAC	GAA	CAT	GAA	GGA	GTT	955
Gly	Arg	Leu	Leu	Gln	Gln	Gly	His	Gly	Leu	His	Glu	His	Glu	Gly	Val	
				235				240						245		
CGT	GGG	CGA	CGA	CAT	CGC	GAC	CGA	GTA	CTC	GGC	GCT	GAT	GTC	GAA	GGT	1003
Arg	Gly	Arg	Arg	His	Arg	Asp	Arg	Val	Leu	Gly	Ala	Asp	Val	Glu	Gly	
			250					255					260			
CGT	GGC	CGA	CGG	CAC	GCT	CAA	GGT	CAA	GTT	CCC	GAT	CAA	CGA	GCC	CGC	1051
Arg	Gly	Arg	Arg	His	Ala	Gln	Gly	Gln	Val	Pro	Asp	Gln	Arg	Ala	Arg	
			265					270				275				

32.10.99

CTGAAGATCC TCCTGGACCG CGACGAGGAC GGCTATCTGCTCCAGATCTT CACCAAGCCG  
 GTCCAGGACC GCCCGACGGT CTTCTTCGAG ATCATCGAAC GCCACGGCTC GATGGGATTC  
 GGCAAGGGCA ACTTCAAGGC CCTGTTCGAG GCGATCGAGC GGGAGCAGGA GAAGCGGGGC  
 AACCTGTAGG CGGCGCGGCC CGGG

1325  
 1385  
 1445  
 1469

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 306 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met	Gln	Pro	His	Ala	Met	Gly	Gly	Ala	Leu	Asn	Thr	Leu	Ser	Ser	Gly	1	5	10	15
Gln	Ala	Asn	Tyr	Cys	Ala	Pro	Cys	Gly	Thr	Glu	Arg	Pro	Cys	Arg	His	20	25	30	
Asp	Ala	Asp	His	Thr	Pro	His	Ser	Arg	His	Arg	Pro	Ala	Gly	Arg	Pro	35	40	45	
Leu	Pro	Gly	Glu	Gly	Asn	Gly	Arg	Gly	Arg	Leu	Arg	Arg	Arg	Gln	Arg	50	55	60	
Gln	Ala	Gly	Arg	Ala	Leu	Leu	His	Arg	Leu	Arg	His	Ala	Ala	Cys	Gly	65	70	75	80
Val	Leu	Arg	Thr	Gly	Glu	Arg	Gln	Pro	Arg	Asp	Arg	Phe	Val	Arg	Pro	85	90	95	
His	Gln	Arg	Leu	Gly	Thr	Leu	Arg	Pro	His	Leu	Arg	His	Gln	Ala	Arg	100	105	110	
His	Pro	Leu	Gly	Pro	Leu	Pro	Arg	Arg	Pro	Cys	Gly	Arg	Ala	Arg	Arg	115	120	125	
Arg	Arg	Arg	Arg	Pro	Arg	His	Arg	Gly	Pro	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Pro	130	135	140	
Arg	Val	Arg	Asp	Arg	Ala	Arg	Arg	Pro	Leu	Gly	Arg	Arg	Ala	Val	Arg	145	150	155	160
Ala	Glu	Gly	Arg	Ala	Arg	His	Gly	Arg	Pro	Arg	Arg	Asp	Arg	His	Leu	165	170	175	
Arg	Gln	Asp	Pro	Pro	His	Pro	Arg	Arg	Pro	Asp	Arg	Leu	Arg	Arg	Pro	180	185	190	
Leu	Pro	Pro	Arg	Leu	Arg	Gly	Arg	Arg	Pro	Asp	Arg	Arg	Thr	Ala	Arg	195	200	205	
Pro	Pro	His	Leu	Pro	Gly	His	Arg	Pro	Leu	Arg	Arg	Gln	Arg	Arg	Ala	210	215	220	
Arg	Pro	Asp	Glu	Arg	Met	Gly	Arg	Leu	Leu	Gln	Gln	Gly	His	Gly	Leu	225	230	235	240
His	Glu	His	Glu	Gly	Val	Arg	Gly	Arg	Arg	His	Arg	Asp	Arg	Val	Leu	245	250	255	
Gly	Ala	Asp	Val	Glu	Gly	Arg	Gly	Arg	Arg	His	Ala	Gln	Gly	Gln	Val	260	265	270	
Pro	Asp	Gln	Arg	Ala	Arg	Pro	Arg	Gln	Glu	Glu	Val	Pro	Asp	Arg	Arg	275	280	285	

BASF Aktiengesellschaft

980734

O.Z. 0050/49415 DE

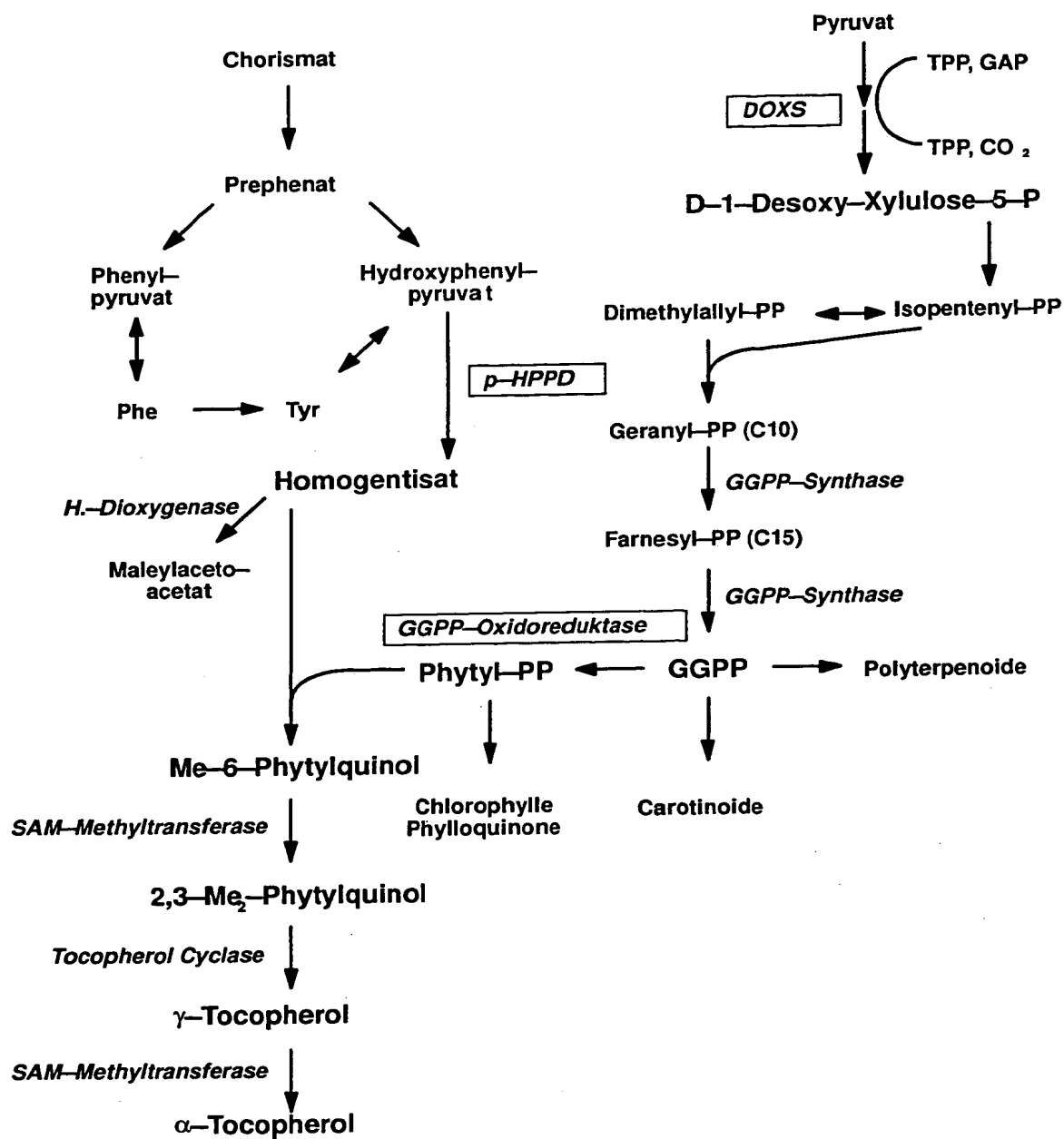
123.1099

Val Pro Gly Val Leu Arg Arg Arg Gly Arg Pro Ala His Arg Ala Glu  
290 295 300  
His Gly  
305

M 23.10.99

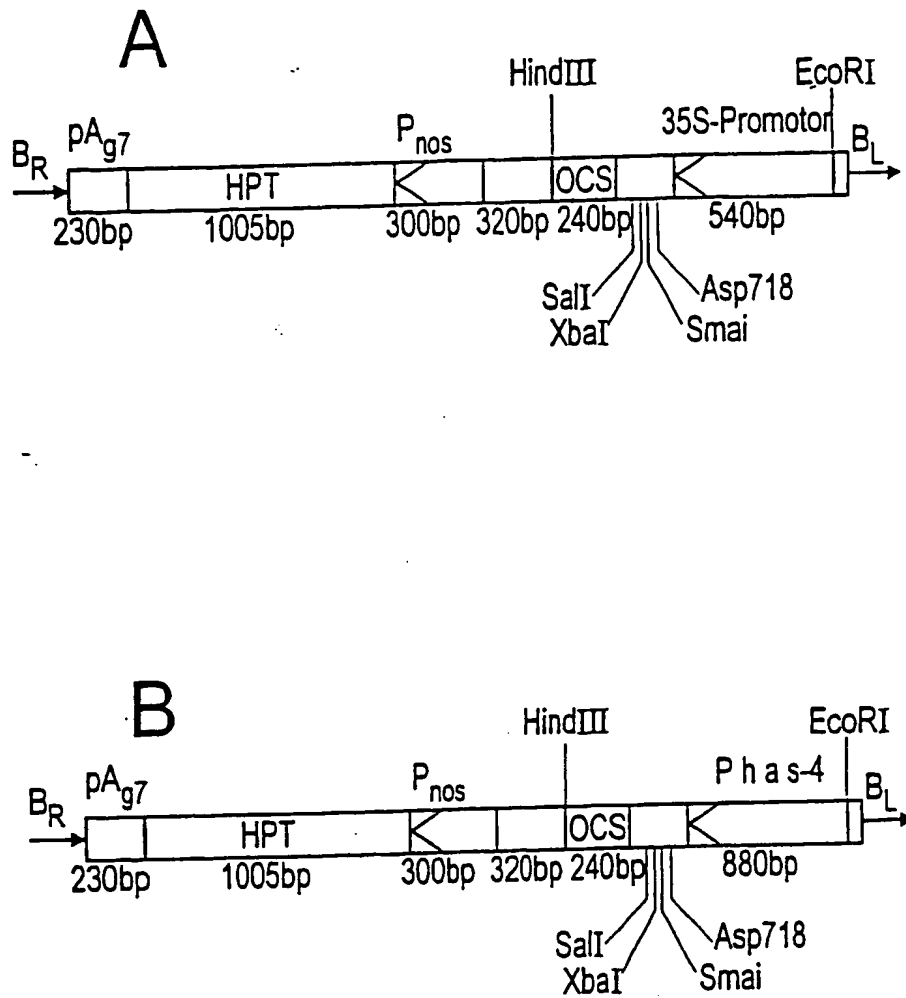
Abbildung 1

## Schematische Übersicht des Prenyllipidstoffwechsels



M 23. 10. 99

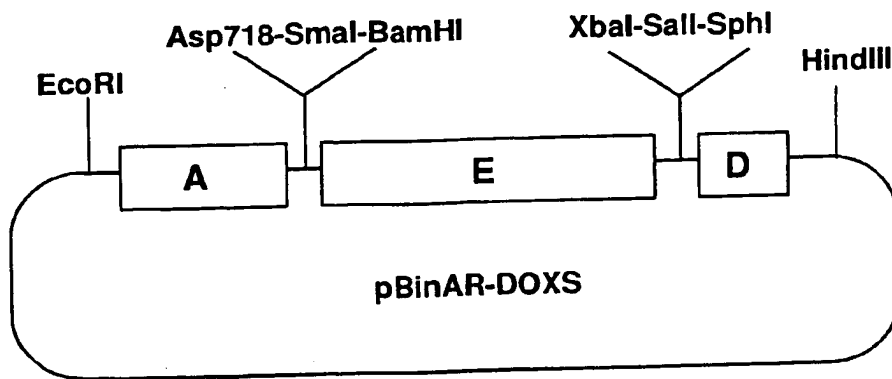
Abbildung 2



M 23.10.99

Abbildung

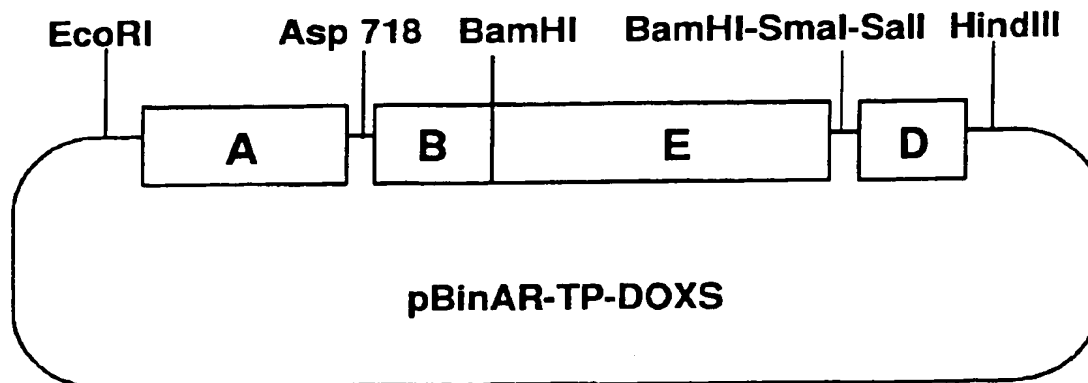
Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E.coli im  
Zytosol transgener Pflanzen



M 23.10.99

Abbildung 4

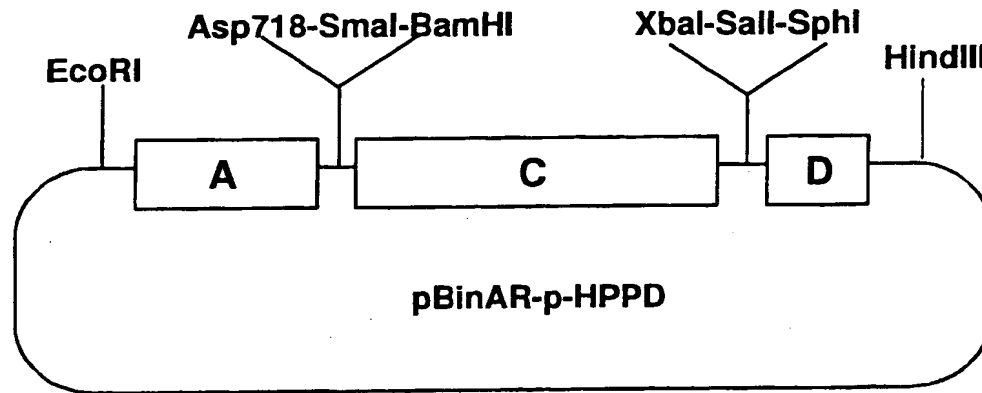
Binärer Vektor zur Überexpression des DOXS-Gens aus E. coli in  
Plastiden transgener Pflanzen.



M 23. 10. 99

Abbildung 5

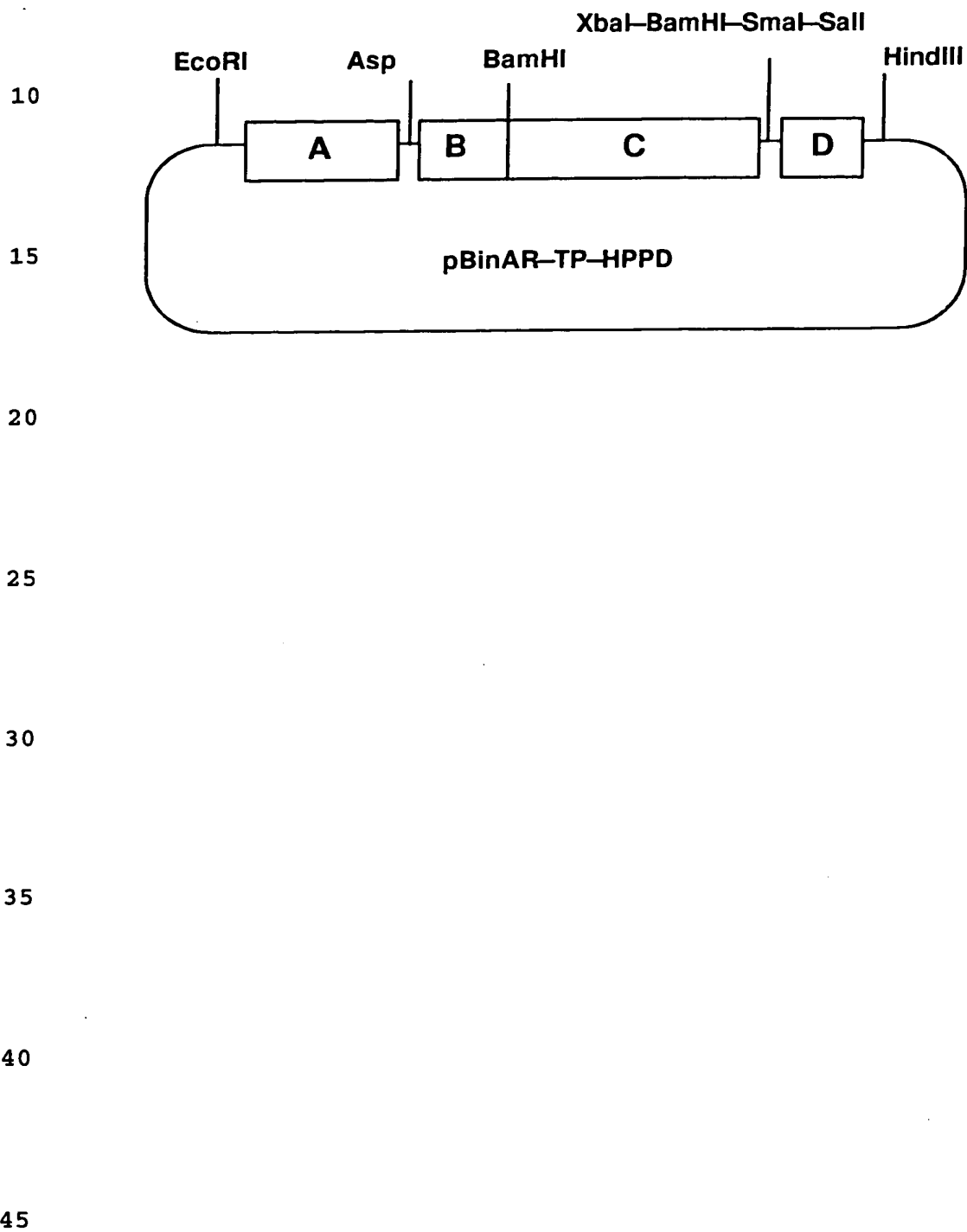
Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces avermitilis* im Zytosol transgener Pflazen



M 23.10.99

Abbildung 6

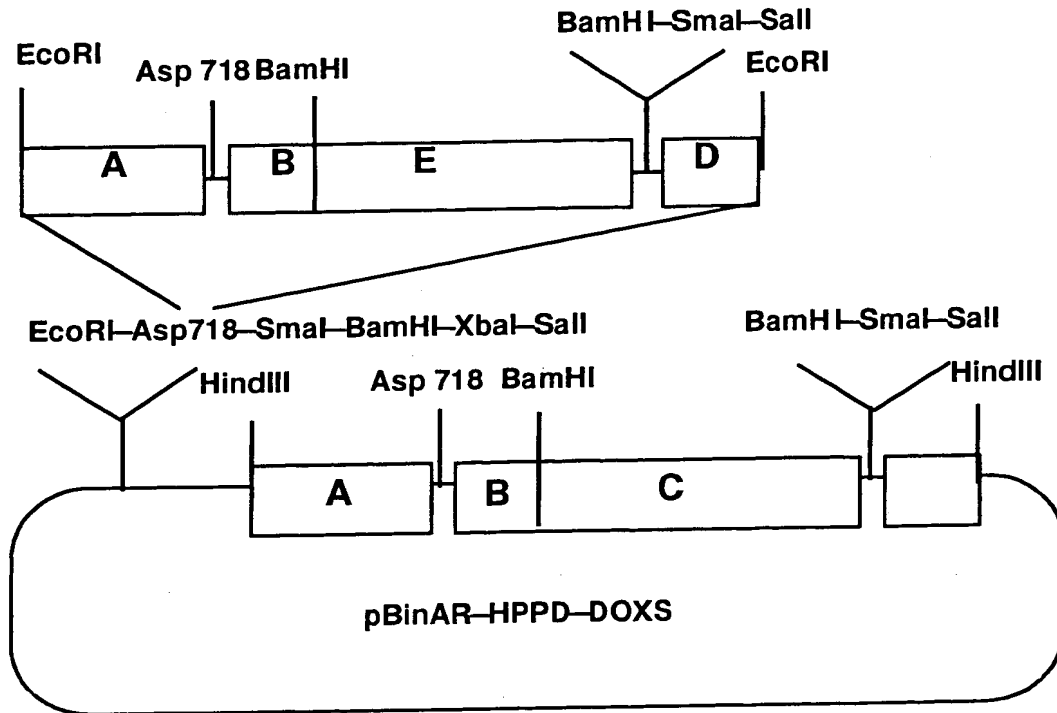
Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-Gens aus *Streptomyces*  
5 *avermitilis* im Plastiden transgener Pflanzen

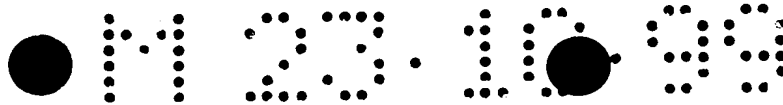


11.23.10.99

Abbildung

Binärer Vektor zur Überexpression des HPPD-gens aus *Streptomyces avermitilis* und des DOXS-Gens aus *E.coli* in Plastiden transgener Pflanzen.





DNA-Sequenzen codierend für ein 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gen und eine p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase und deren Überproduktion in Pflanzen

5

Zusammenfassung

Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit erhöhter Vitamin E Biosyntheseleistung durch Überexpression eines 1-Deoxy-D-Xylulose-5-Phosphat Synthase-Gens aus E.coli und einer p-Hydroxyphenylpyruvat Dioxygenase aus Streptomyces avermitilis.

15

20

25

30

35

40

45

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**